GeneXpert®
Powered By CEPHEID INNOVATION

Xpert BCR-ABL Monitor™

REF BCR-100N-10

Cepheid

CE IVD 300-4073, Rev. C

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089-1189
Tel: +1.408.541.4191
Fax: +1.408.541.4192
Technical Support toll-free: +1.888.838.3222

EC REP
Cepheid Europe
Vira-Solelh
81470 Maurens-Scopont - France
Tel: +33.563.82.53.00
Fax: +33.563.82.53.01
Technical Support: +33.563.82.53.19

English

In Vitro Diagnostic Medical Device

Proprietary Name

Xpert BCR-ABL Monitor™

Common or Usual Name

Xpert BCR-ABL Monitor

Intended Use

Xpert BCR-ABL Monitor, which detects the BCR-ABL chromosomal translocation, is a real-time reverse transcription PCR (RT-PCR) assay intended as an aid in the monitoring of the p210 (b2a2 and b3a2) transcript in peripheral blood lymphocytes (PBL) of patients with chronic myelogenous leukemia (CML). A significant increase in the p210 transcript should be confirmed by another method, such as standard metaphase cytogenetic analysis of a bone marrow specimen from the patient.

Summary and Explanation

Chronic myelogenous leukemia (CML) is part of a group of diseases called the myeloproliferative disorders, with an estimated 4600 newly diagnosed cases and 850 deaths in 2005.[1] More than 95% of patients with CML have the distinctive Philadelphia chromosome (Ph1) that results from a reciprocal translocation between the long arms of chromosomes 9 and 22. The translocation involves the transfer of the Abelson (ABL) gene on chromosome 9 to the breakpoint cluster region (BCR) of chromosome 22, resulting in a fused BCR-ABL gene.[2, 4] The fusion gene produces a protein, p210 (b2a2 and b3a2), a tyrosine kinase with deregulated activity that plays a key role in the development of CML.[3]

Current Europe Against Cancer Program and National Comprehensive Cancer Network (NCCN) practice guidelines for management of patients with CML call for use of reverse transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) assays during the initial workup of patients with chronic phase CML, in monitoring for minimal residual disease, and in identifying patients who may be at a high risk for relapse.[3, 15] RT-PCR has been shown to be an accurate and highly sensitive method for detection of the BCR-ABL fusion gene,[3-14] and is more sensitive than Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) or cytogenetics.[3] An additional advantage of quantitative PCR versus FISH and cytogenetics is the high correlation of PCR results obtained from bone marrow and peripheral blood samples.[3, 15] Therefore, PCR could potentially reduce the bone marrow aspirations currently required in patients with CML. Although quantitative PCR will likely become the standard for monitoring residual disease, the method is currently not widely available, because of variation in techniques and controls, and the lack of commercially available assays.[3]

Principle of the Procedure

The GeneXpert® Dx System automates and integrates sample purification, nucleic acid amplification, and detection of the target sequence in simple or complex samples using real-time RT-PCR. The system consists of an instrument, personal computer, and preloaded software for running tests on collected specimens and viewing the results. The system requires the use of single-use disposable GeneXpert cartridges, vessels that hold the PCR reagents and host the PCR process. Because the cartridges are self-contained, cross-contamination concerns are eliminated. For a full description of the system, see the *GeneXpert Dx System Operator Manual*.

Used with the GeneXpert Dx System, the Xpert BCR-ABL Monitor is designed to detect the BCR-ABL translocation transcript and the ABL endogenous control sequence in peripheral blood specimens.[15-18] Specifically, the BCR-ABL primers and probe are designed for the detection of the BCR-ABL p210 (b2a2 and b3a2) major breakpoint translocation and the ABL primers and probe are designed for the detection of the ABL sequence. None of the ABL primers or probes overlap the site of any ABL kinase mutation reported to date.

To run a test, the sample mixture and three reagents are transferred into designated chambers of the Xpert BCR-ABL Monitor cartridge, the cartridge is loaded into the instrument, and test information is supplied in the system software. During the test process, the GeneXpert Dx System (1) moves the sample and reagents into different chambers in the cartridge, (2) isolates the total RNA from whole blood by binding the RNA to the solid phase material, (3) washes and rinses away inhibitors, (4) elutes the RNA, (5) hydrates the reagent beads and combines the mixture with the eluted RNA, (6) moves the sample and reagent mixture into the reaction tube, (7) performs quality checks to ensure that sample preparation is successful, and (8) performs RT-PCR followed by nested real-time PCR. The test process for BCR-ABL takes approximately 2 hours and 20 minutes.

Reagents and Instruments

Material Provided

The Xpert BCR-ABL Monitor kit (BCR-100N-10) contains sufficient reagents to process 10 patient or quality control specimens. The kit contains 10 individual assay packs. Each assay pack contains the following:

- Xpert BCR-ABL Monitor cartridge
  - Primers (forward and reverse)
  - Probes
  - dNTPs
  - Reverse transcriptase
  - Taq polymerase
  - Tris-HCl, pH 8.6
  - HEPES, pH 7.2
  - KCl
  - $MgCl_2$
  - BSA (bovine serum abumin)
- Blood Sample Preparation reagents
  - Sample Container (S)
  - Proteinase K (PK)—50 µl
    - $CaCl_2$
    - Glycerol
    - Proteinase K
    - Tris-HCl, pH 7.5
  - Lysis Reagent (LY)—1.8 ml
    - $CaCl_2$
    - Guanidine HCl
    - EDTA
    - SDS
    - Tris-HCl, pH 6.4
    - Tween-20
    - Urea
  - Wash Reagent (1)—3.3 ml
    - Ethanol
    - Guanidine thiocyanate
    - Tris-HCl, pH 7.0
  - Rinse Reagent (2)—1.8 ml
    - Cysteamine HCl
    - EDTA
    - KCl
    - Monothioglycerol (MTG)
    - PEG
    - Sodium azide
    - Tris, pH 7.0
    - Tween-20
    - Water
  - Elution Reagent (3)—1.8 ml
    - DEPC-treated water
    - Sodium azide

Notes:

- Material Safety Data Sheets (MSDS) for all reagents provided in this assay are available upon request from Cepheid Technical Support.
- The bovine serum albumin (BSA) in this product was produced exclusively from bovine plasma sourced in the United States. The manufacturing of the BSA is also performed in the United States. No ruminant protein or other animal protein was fed to the animals; the animals passed ante- and post-mortem testing. During processing, there was no commingling of the material with other animal materials.

Storage and Handling

- Store the Xpert BCR-ABL Monitor kit contents at 2-8 °C.
- Do not use cartridges or reagents that have passed the expiration date.
- Do not open the reagents until they are ready to be used.
- Use the Xpert BCR-ABL Monitor assay pack within 30 minutes after opening.
- Except for the Lysis Reagent, do not use reagents that have become cloudy or discolored.
- If the Lysis Reagent is cloudy, heat at 56 °C for 5 minutes before use.

Material Required But Not Provided

- GeneXpert Dx System
- Vortexer
- Microcentrifuge (1000 g minimum)
- Pipettes and aerosol filter pipette tips (suggested sizes: 200 µl and 1000 µl)
- 100% ethanol
- (Optional) Transfer pipettes

Note: The GeneXpert Dx System catalog number varies by configuration. Contact Cepheid for the desired configuration and corresponding catalog number.

Warnings and Precautions

- All biological specimens should be treated as if they are capable of transmitting infectious agents. Because it is often impossible to know which might be infectious, all human specimens should be treated with universal precautions. Guidelines for specimen handling are available from the World Health Organization[19] or U.S. Centers for Disease Control and Prevention.[20]
- All hazardous materials should be disposed of according to your laboratory's safety guidelines.
- Do not substitute Xpert EV reagents with other reagents.
- Over a period of time, sodium azide may react with copper, lead, brass, or solder in plumbing systems to form an accumulation of the highly explosive compounds of lead azide and copper azide.[21]
- The Wash Reagent contains guanidine thiocyanate, which can form highly reactive compounds when combined with bleach. If liquid containing this reagent is spilled, clean the area with laboratory detergent and water.
- Failure to follow procedures and conditions described in this document and use of reagents other than those provided in this kit can cause incorrect results and adverse effects. For example, do not add more than the required amount of sample and reagents.
- Excessively high white blood cell counts might cause pressure to build in the cartridge and lead to aborted runs.
- Dropping or shaking the Xpert BCR-ABL Monitor cartridges after adding sample and reagents can cause the contents to spill into the wrong chambers, thus producing invalid results. Bent or broken reaction tubes can also produce invalid results. Do not shake and avoid dropping the cartridge. If the reaction tube is bent or broken, do not use the cartridge.

Specimen Collection and Transport

Collect peripheral blood specimens according to standard techniques for RT-PCR at each institution. Collect blood specimens in tubes containing EDTA or sodium citrate as anticoagulant. Store blood specimens at 2-8 °C and test within 48 hours of collection. Do not use heparin as the anticoagulant because it might inhibit the PCR reaction.

Procedure

Cautions

- Follow your laboratory safety procedures for working with chemicals and handling specimens.
- Dedicate a set of pipettes and reagents exclusively to sample preparation. Separate used cartridges from unused cartridges and reagents.
- Do not open the Xpert BCR-ABL Monitor cartridge lid except when adding sample and reagents.
- Do not shake the cartridge.
- Do not load a Xpert BCR-ABL Monitor cartridge that has been dropped or shaken after you have inserted the sample and reagents. Do not load a cartridge that has a damaged reaction tube.
- Do not open used Xpert BCR-ABL Monitor cartridges.
- Dispose of the used Xpert BCR-ABL Monitor cartridges according to your laboratory's safety guidelines.

Before You Begin

Before you start the procedure, briefly centrifuge the following reagents at 1000 g for 10 seconds:

- Proteinase K (PK)
- Lysis Reagent (LY)
- Rinse Reagent (2)
- Elution Reagent (3)

Preparing the Cartridge

1. Remove the Sample Preparation reagents from the sealed tray.
2. To the empty 5-ml vial labeled Sample Container (S), add 40 µl of Proteinase K (PK).
3. To the Sample Container (S) already containing Proteinase K, add 200 µl of blood specimen.
4. Vortex for 5 seconds.
5. Incubate at room temperature for 1 minute.
6. To the Sample Container (S), add 1 ml of Lysis Reagent (LY).
7. Vortex for 10 seconds.
8. Incubate at room temperature for 10 minutes.
9. To the Sample Container (S), add 1 ml of 100% ethanol.
10. Vortex for 10 seconds. Set aside.
11. Remove a cartridge from the sealed tray.

12. Open the cartridge lid and transfer the contents from the reagent tubes and the Sample Container to the cartridge chambers as follows (figure 1):
    - **S**—Pipette the entire contents from the Sample Container (S).
    - **1**—Pipette at least 2.1 ml of the contents from the Wash Reagent tube (1).
    - **2**—Pipette at least 1 ml of the contents from the Rinse Reagent tube (2).
    - **3**—Pipette at least 1 ml of the contents from the Elution Reagent tube (3).
13. Close the cartridge lid. Make sure the lid snaps firmly into place.

Important: Be sure to load the cartridge into the GeneXpert Dx instrument and start the test within 15 minutes of preparing the cartridge.

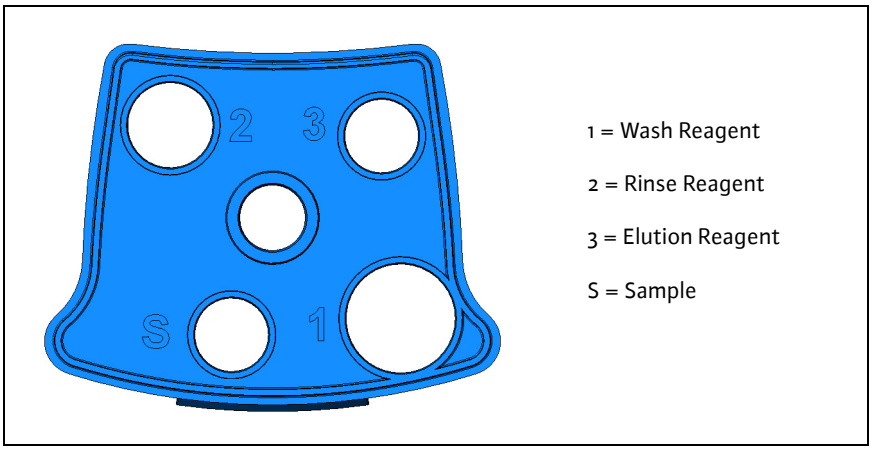

Figure 1. Xpert BCR–ABL Monitor cartridge chambers.

Running the Test

This section lists the basic steps of running the test. For detailed instructions, see the *GeneXpert Dx System Operator Manual.*

1. Turn on the computer, and then turn on the GeneXpert Dx instrument.
2. On the Windows® desktop, double-click the GeneXpert Dx shortcut icon.
3. Log on to the GeneXpert Dx System software using your user name and password.
4. In the GeneXpert Dx System window, click **Define Assays** and make sure the Xpert BCR-ABL Monitor assay definition is imported into the software. (See the instructions provided with the assay CD.) If you do not have the Xpert BCR-ABL Monitor CD, contact Cepheid Technical Support.
5. In the GeneXpert Dx System window, click **Create Test.** The Create Test window appears.
6. Scan the Xpert BCR-ABL Monitor cartridge bar code. The software automatically fills in the following fields: Select Assay, Reagent Lot ID, and Expiration Date.
7. Select the instrument module.
8. In the **Sample ID** box, scan or type the sample ID. Make sure you type the correct sample ID. The sample ID is associated with the test results and is shown in the View Results window and all the reports.
9. Click **Start Test.** In the dialog box that appears, type your password.
10. Open the instrument module door with the blinking green light and load the cartridge. Close the door. When the test is finished, the instrument module light turns off.
11. Open the instrument module door and remove the cartridge. Follow your laboratory safety guidelines for discarding the cartridge.

Viewing and Printing Results

For detailed instructions on how to view and print the results, see the *GeneXpert Dx System Operator Manual.*

CONTROL Quality Control

Each test contains an Endogenous Control (ABL) and a Probe Check Control. No external controls are required. However, for additional quality control, two external controls can be tested once per month.

- **Endogenous Control**—Normalizes targets and ensures sufficient sample is used in the test. Because of its low variability, the endogenous control can also be used to indicate sample-inhibitor contamination. The endogenous control is taken from the specimen sample.
- **Probe Check**—Verifies the presence and the integrity of the labeled probes. A probe-check status of Pass indicates that the probe check results meet the acceptance criteria.

Interpretation of Results

Valid ABL C_t

- ABL C_t must be greater than or equal to 12 and less than or equal to 18, with an endpoint value greater than or equal to 200.
- If the ABL C_t value is less than 12, the endpoint is less than 200, or the PCR curve is misshaped, repeat the test, using 20 µl of the original specimen.
- If the ABL C_t value is greater than 18, repeat the test with fresh specimen.

Valid Positive BCR-ABL C_t

- BCR-ABL C_t must be greater than or equal to 12, or it must be less than or equal to 32 with an endpoint value greater than or equal to 40.
- If the BCR-ABL C_t value is less than 12, repeat the test, using 20 µl of the original specimen.
- If the BCR-ABL C_t value is greater than 32, the BCR-ABL transcripts are not detected.

Qualitative Results

- Any BCR-ABL C_t value less than 32 and has a valid ABL C_t value results in a positive detection for BCR-ABL transcripts.
- The absence of a BCR-ABL C_t value or a BCR-ABL value greater than 32, along with a valid ABL result, will be called undetectable for BCR-ABL.

Quantitative Results

A certificate of analysis is supplied with each Xpert BCR-ABL Monitor kit and contains a lot-specific standard curve for the Xpert BCR-ABL Monitor and an Efficiency value ($E_{\Delta Ct}$). The standard curve reports ΔC_t ($C_{t(ABL)}$ - $C_{t(BCR-ABL)}$) as a function of K562 RNA concentration in a background of normal whole blood RNA. The efficiency value ($E_{\Delta Ct}$) is calculated from the slope of the standard curve as follows: $E_{\Delta Ct} = 10^{(1/slope)}$.

- **BCR-ABL Positive Tests**—For a positive test result, the % ratio BCR-ABL/ABL is calculated using the following equation. The $E_{\Delta Ct}$ value is obtained from the lot-specific certificate of analysis that is supplied with the assay kit. The Test ΔC_t value is obtained from the View Results window (Target Delta Ct column) of the GeneXpert Dx System software (figure 2).

  % ratio BCR-ABL/ABL $= E_{\Delta Ct}^{(\Delta Ct)} \times 100$

  Example

  Lot-specific $E_{\Delta Ct} = 1.915$
  Test $\Delta C_t = -2.9$
  % ratio BCR-ABL/ABL $= 1.915^{(-2.9)} \times 100 = 15.195\%$

  Result: Positive for BCR-ABL, detected at the ratio of 15.195%

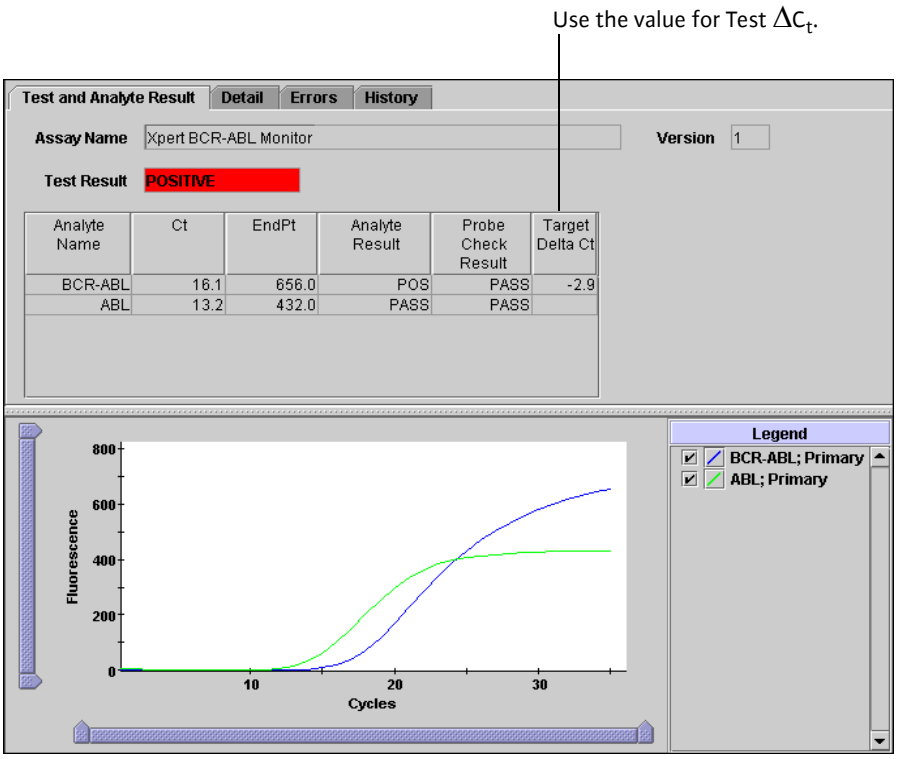

Figure 2. GeneXpert Dx System – View Results window, positive result.

- **BCR-ABL Negative Tests**—For ABL values greater than 12 but less than 18, if BCR-ABL is undetectable, first calculate a theoretical BCR-ABL ratio before reporting the results. To do this, subtract 32 from the test ABL C_t value (test ABL Ct - 32). The ABL C_t value is obtained from the View Results window (Ct column) of the GeneXpert Dx System software (figure 3). Calculate the theoretical % ratio BCR-ABL. Report a result as less than the theoretical % ratio, the value that would have been observed if a true BCR-ABL C_t value of 32 were measured.

  Example

  Lot-specific $E_{\Delta Ct} = 1.915$
  Test ABL $C_t = 15.4$
  Theoretical $\Delta C_t = (15.4-32) = -16.6$
  Theoretical % ratio BCR-ABL/ABL = $1.915^{(-16.6)} \times 100 = 0.0021\%$

  Result: BCR-ABL not detectable at a detection limit of 0.0021%

If no BCR-ABL is detected, use the ABL value to determine if additional testing is required. For example, if the ABL C_t value is greater than 15, the limit of detection might be greater than 0.001%. If low levels of BCR-ABL are suspected, repeat the test. Late ABL C_t values might also require the test to be repeated.

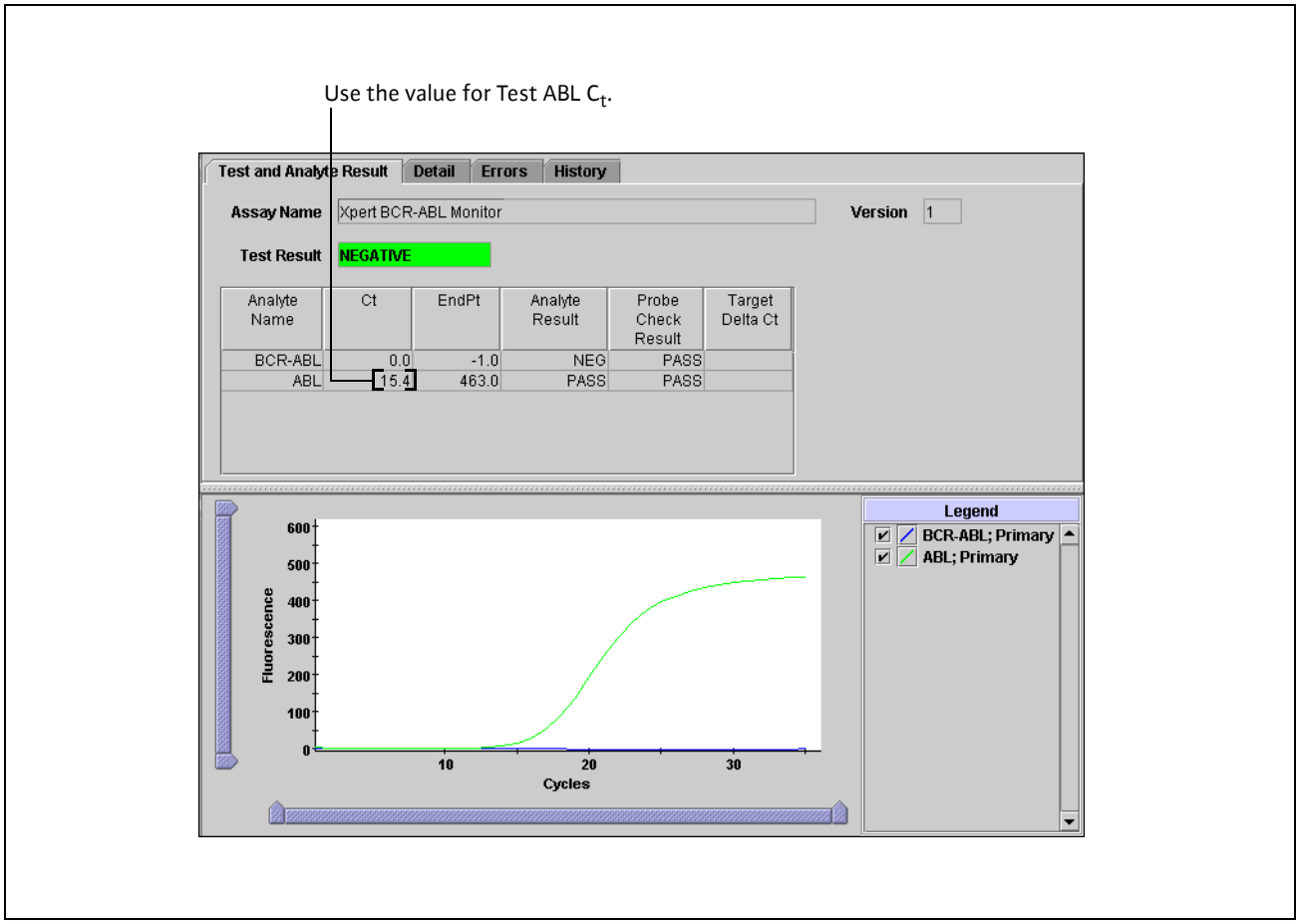

Figure 3. GeneXpert Dx System – View Results window, negative result.

Reasons to Repeat the Assay

An INVALID and/or ND result indicates that one or both of the controls (ABL or Probe Check) has failed or there was a processing problem. The run is invalid and should be repeated with fresh specimen.

For a description of error messages and troubleshotting information, see the *GeneXpert Dx System Operator Manual.*

Limitations

- The performance of the Xpert BCR-ABL Monitor was validated using the procedures provided in this package insert only. Modifications to these procedures can alter the performance of the test.
- Results from the Xpert BCR-ABL Monitor should be interpreted in conjunction with other laboratory and clinical data available to the clinician.
- The Xpert BCR-ABL Monitor will not detect the p190 or other translocations that may be present in a peripheral blood sample from a patient with leukemia.
- The Xpert BCR-ABL Monitor should be run using EDTA or citrate anticoagulated whole blood. Heparin is not suitable as an anticoagulant because it inhibits the PCR reaction.
- Each single-use Xpert BCR-ABL Monitor cartridge is used to process one test. Do not reuse spent cartridges.

Performance Characteristics

Precision

Precision was evaluated in a three-site, blinded, comparative study using four specimens with varying concentrations of BCR/ABL. A total of 240 specimens were included in the study. Study specimens consisted of four sample levels: negative; and one each of low, moderate, and high BCR-ABL RNA levels. These specimens were prepared using whole blood (collected with citrate anticoagulant) from normal healthy donors with different amounts of K562 RNA (Ambion Catalog # 7832) added after the blood specimens were lysed. Each site received a total of 80 specimens consisting of 20 specimens from each of the four different levels. The specimens were analyzed in a total of 20 runs of four specimens, four runs per day for five days. Four specimens, one specimen from each level, were included in each run. Two technologists from each site participated in the study, each performing two runs of four specimens each per day. The GeneXpert determined the level of BCR/ABL in each specimen. Precision was estimated in accordance with the CLSI guideline for evaluation of precision performance of clinical chemistry devices.[22]

Table 1. Assay precision.

Site	Sample	N	Ave. % BCR-ABL/ABL	% BCR-ABL/ABL Std. Dev.	95% CI	% CV
1	Negative BCR-ABL	20	< 0.000133% (negative)	—	—	—
2	Negative BCR-ABL	20	< 0.000175% (negative)	—	—	—
3	Negative BCR-ABL	20	< 0.000163% (negative)	—	—	—
Overall	Negative BCR-ABL	60	< 0.000157% (negative)	—	—	—
1	Low BCR-ABL	20	0.00477%	0.00477%	0.00218 – 0.00737%	100.0%
2	Low BCR-ABL	19	0.00285%	0.00285%	0.00125 – 0.00445%	100.0%
3	Low BCR-ABL	20	0.00528%	0.00528%	0.00241 – 0.00815%	100.0%
Overall	Low BCR-ABL	59	0.00430%	0.00524%	0.00273 – 0.00587%	121.8%
1	Moderate BCR-ABL	20	1.003%	0.324%	0.827 – 1.179%	32.3%
2	Moderate BCR-ABL	20	0.856%	0.427%	0.624 – 1.088%	49.8%
3	Moderate BCR-ABL	19	1.005%	0.433%	0.762 – 1.248%	43.1%
Overall	Moderate BCR-ABL	59	0.954%	0.397%	0.835 – 1.073%	41.6%
1	High BCR-ABL	20	12.18%	2.40%	10.88 – 13.49%	19.7%
2	High BCR-ABL	20	12.34%	7.31%	8.36 – 16.32%	59.2%
3	High BCR-ABL	20	12.18%	4.10%	9.95 – 14.41%	33.7%
Overall	High BCR-ABL	60	12.24%	5.03%	10.74 – 13.73%	41.1%

Clinical Performance:

The performance of the assay was tested at three sites using a collection of 46 samples from patients with CML. Both sites also ran their laboratory-developed assay for comparison. The data were grouped into three categories:

- Negative (<0.01% BCR-ABL detected)
- Low positive (0.01% to 0.05% BCR-ABL detected)
- High positive (>0.05% BCR-ABL detected)

Table 2. Assay performance

Test results	Number of CML Samples
Negative by both methods	17
Negative by the laboratory-developed method but low positive by the GeneXpert	3
Low positive by both methods	8
High positive by both methods	18

Agreement of negative results: 17/20 = 85%
Agreement of positive results: 26/26 = 100%

Specificity

The specificity of the assay was tested using 44 normal citrate and EDTA blood specimens from four sites. All normal samples were negative for BCR-ABL, yielding a specificity of 100%.

The specificity of the assay was also tested at three sites using a collection of 12 blood specimens from patients with other hematologic disorders including acute myelogenous leukemia, acute lymphocytic leukemia, Hodgkin's lymphoma, multiple myeloma, and follicular lymphoma. All these samples were negative for BCR-ABL, yielding a specificity of 100%.

Limit of Detection and Linearity

Figure 4 shows limit of detection and linearity data generated from a single run of 44 cartridges. The procedure described in this package insert was used with the following exceptions: A dilution series of Leukemia (K562) Total RNA from Ambion (catalog number 7832) was spiked into citrate anti-coagulated normal blood after ethanol was added to the Sample Container. Four replicates were run for each RNA concentration with the following exceptions: six replicates were run for 30 pg and 10 pg samples.

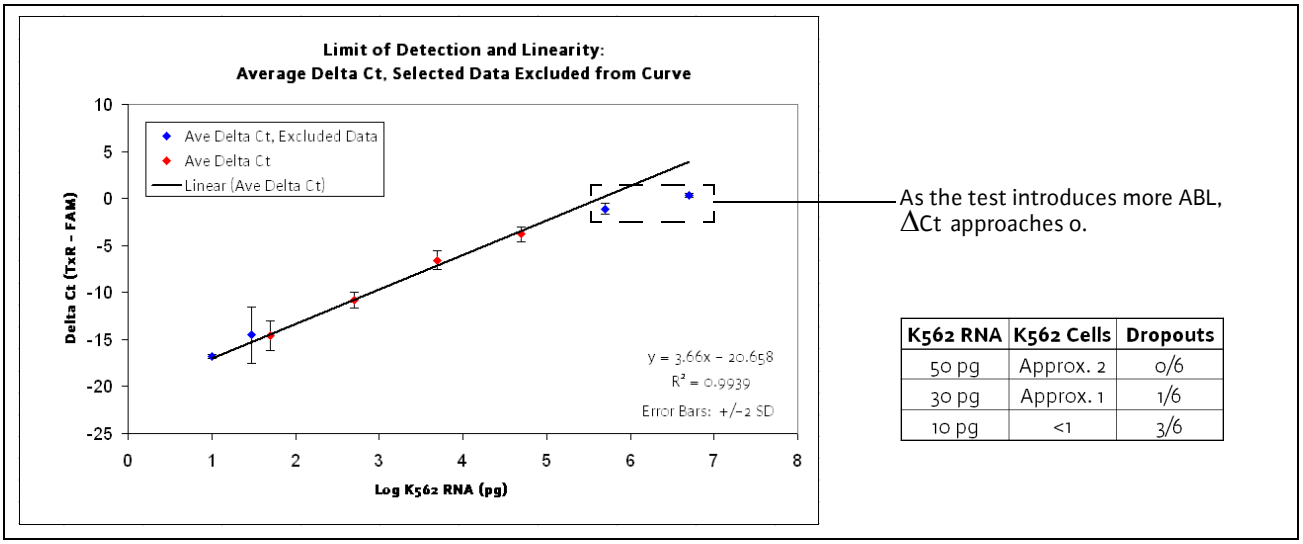
Limit of Detection and Linearity:
Average Delta Ct, Selected Data Excluded from Curve
Ave Delta Ct, Excluded Data
Ave Delta Ct
Linear (Ave Delta Ct)
Delta Ct (TxR - FAM)
Log K562 RNA (pg)
y = 3.66x - 20.658
R² = 0.9939
Error Bars: +/-2 SD
As the test introduces more ABL, ΔCt approaches 0.
K562 RNA | K562 Cells | Dropouts
50 pg | Approx. 2 | 0/6
30 pg | Approx. 1 | 1/6
10 pg | <1 | 3/6

Figure 4. Limit of detection and linearity data.

References

[1] Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer Statistics 2005. CA Cancer J Clin. 2005;55:10-30.

[2] Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. Nature. 1973;243:290-293.

[3] NCCN. Clinical Practice Guidelines in Oncology; Chronic Myelogenous Leukemia. Version 1. 2006.

[4] Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. Blood. 2005;105(7):2640-2653.

[5] Kantarjian HM, Talpaz M, Cortes J, et al. Quantitative polymerase chain reaction monitoring of BCR-ABL during therapy with imatinib mesylate (STI571;Gleevec) in chronic-phase chronic myelogenous leukemia. Clin Cancer Res. 2003;9(1):160-6.

[6] Gabert J et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia-A Europe Against Cancer Program. Leukemia 2003;1-40.

[7] Sawyers C. Chronic Myeloid Leukemia. NEJM. 1999;340(17):1330-40.

[8] Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood. 2000;96(10):3343-56.

[9] Goldman JM, Kaeda JS, Cross NC. Clinical decision making in chronic myeloid leukemia based on polymerase chain reaction analysis of minimal residual disease. Blood. 1999;94(4):1484-6.

[10] Radich JP. The detection and significance of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia. Medicina (B Aires) 2000;60 Suppl 2:66-70.

[11] Hochhaus A, Reiter A, Skladny H, et al. Molecular monitoring of residual disease in chronic myelogenous leukemia patients after therapy. Recent Results Cancer Res 1998;144:36-45.

[12] Hochhaus A, Reiter A, Saussele S, et al. Molecular heterogeneity in complete cytogenetic responders after interferon-alpha therapy for chronic myelogenous leukemia: low levels of minimal residual disease are associated with continuing remission. German CML Study Group and the UK MRC CML Study Group. Blood. 2000;95(1):62-6.

[13] Radich JP, Gehly G, Gooley T, et al. Polymerase chain reaction detection of the BCR-ABL fusion transcript after allogeneic marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: results and implications in 346 patients. Blood 1995;85(9):2632-8.

[14] Olavarria E, Kanfer E, Szydlo R, et al. Early detection of BCR-ABL transcripts by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction predicts outcome after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. Blood. 2001;97(6):1560-5.

[15] Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer Program. Leukemia. 2003;17:2318-2357.

[16] Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) - a Europe Against Cancer Program. Leukemia. 2003;17:2474-2486.

[17] van der Velden VH, Boeckx N, Gonzalez M, et al. Differential stability of control gene and fusion gene transcripts over time may hamper accurate quantification of minimal residual disease--a study within the Europe Against Cancer Program. Leukemia. 2004;18:884-886.

[18] van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. Leukemia. 2003;17:1013-1034.

[19] World Health Organization. Guidelines on Standard Operating Procedures for HAEMATOLOGY, from http://w3.whosea.org/EN/Section10/Section17/Section53.htm.

[20] U.S. Centers for Disease Control. Morbidity and Mortality Weekly Review. 1987;36(suppl. 2S):2S-18S.

[21] NIOSH Publication No. 2005-151: NIOSH Pocket Guide to Chemical Hazards, September 2005.

[22] CLSI. Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline. CLSI document EP5-A (ISBN 1-56238-368-X). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898, USA, 1999.

Patent Notice to Purchaser

Purchase of this product from Cepheid authorizes the purchaser to use this product one time for the purchaser's own internal use in conjunction with a Cepheid GeneXpert instrument under the following U.S. Patents and their foreign equivalents: 6,374,684; 6,878,540; 6,818,185; 6,881,541; 5,958,349; 6,391,541; 6,887,693; 6,431,476; and 6,739,531.

THE PURCHASE OF THIS PRODUCT ALLOWS THE PURCHASER TO USE IT FOR THE PERFORMANCE OF DIAGNOSTIC SERVICES FOR HUMAN IN VITRO DIAGNOSTICS. NO GENERAL PATENT OR OTHER LICENSE OF ANY KIND OTHER THAN THIS SPECIFIC RIGHT OF USE FROM PURCHASE IS GRANTED HEREBY.

NO OTHER RIGHTS ARE CONVEYED EXPRESSLY, BY IMPLICATION OR ESTOPPEL TO ANY OTHER PATENTS. FUTHERMORE, NO RIGHTS FOR RESALE ARE CONFERRED WITH THE PURCHASE OF THIS PRODUCT.

Assistance

For assistance, contact Cepheid using one of the following contact details. Make sure you provide the instrument serial number and reagent lot ID when you call or email.

North America

For technical support, use the following contact details:

Tel: +1.888.838.3222
Email: techsupport@cepheid.com

You can reach Cepheid Technical Support by telephone Monday through Friday, from 6 A.M. to 5 P.M. Pacific time.

European Union

For technical support, use the following contact details:

Tel: +33.563.82.53.19
Email: techsupport@cepheideurope.fr

Other Locations

Contact your local Cepheid representative.

Table of Symbols

Symbol	Meaning
	Catalog number
	In vitro diagnostic medical device
	Do no reuse
	Manufacturer
	Contains sufficient for <n> tests
	Control
	Authorized representative in the European Community
	Temperature limitation
	Biological hazard

Manufacturer

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089-1189

Phone: +1.408.541.4191
Fax: +1.408.541.4192

Authorized Representative

Cepheid Europe
Vira-Solelh
81470 Maurens-Scopont
France

Tel: +33.563.82.53.00
Fax: +33.563.82.53.01
Email: cepheid@cepheideurope.fr

February 2006

Français

Appareil à usage médical de diagnostic *in vitro*

Nom déposé

Xpert BCR-ABL Monitor™

Nom d'usage

dispositif BCR-ABL Xpert

Utilisation prévue

Le dispositif BCR-ABL Xpert, qui détecte la translocation chromosomique BCR-ABL, est un test PCR de transcription inverse en temps réel (RT-PCR) destiné à aider à la surveillance de la transcription p210 (b2a2 et b3a2) dans les lymphocytes du sang périphérique (LSP) des patients atteints de leucémie myéloïde chronique (LMC). Une augmentation significative de la transcription p210 doit être confirmée par une autre méthode, comme une analyse cytogénétique standard de la métaphase d'un échantillon de moelle osseuse du patient.

Résumé et explication

La leucémie myéloïde chronique (LMC) fait partie d'un groupe d'affections appelées syndromes myéloprolifératifs ; près de 4 600 nouveaux cas ont été diagnostiqués en 2005 et le nombre de décès s'est élevé à 850 cette même année.[1] Plus de 95 % des patients atteints de LMC possèdent le chromosome distinctif Philadelphia (Ph1), qui provient de la translocation réciproque entre les bras longs des chromosomes 9 et 22. La translocation occasionne le transfert du gène Abelson (ABL) du chromosome 9 vers la région BCR (breakpoint cluster region) du chromosome 22, aboutissant à un gène de fusion BCR-ABL.[2, 4] Le gène de fusion produit une protéine, p210 (b2a2 et b3a2), une tyrosine kinase dont l'activité déréglée joue un rôle clé dans le développement de la LMC.[3]

Les conseils pratiques actuels prodigués par le programme Europe Against Cancer et le National Comprehensive Cancer Network (NCCN) afin de gérer les patients atteints de LMC demandent l'utilisation des tests de Transcription Inverse - Amplification en Chaîne par Polymérase (RT-PCR) au cours du traitement initial des patients en phase chronique de LMC, de la surveillance des maladies résiduelles minimales et de l'identification des patients qui peuvent présenter un fort risque de rechute.[3, 15] Il est prouvé que la méthode RT-PCR est fiable et très sensible pour la détection du gène de fusion BCR-ABL,[3-14] et qu'elle est plus sensible que l'hybridation in situ fluorescente (FISH) ou que la cytogénétique.[3] Un avantage supplémentaire de la PCR quantitative par opposition à la FISH et à la cytogénétique réside dans la forte correspondance des résultats de la PCR obtenus à partir d'échantillons de moelle osseuse et de sang périphérique.[3, 15] Par conséquent, la PCR peut potentiellement réduire les aspirations de moelle osseuse requises actuellement chez les patients atteints de LMC. Il est possible que la PCR quantitative devienne la norme en matière de surveillance des maladies résiduelles ; néanmoins, la méthode n'est actuellement pas largement utilisée, à cause de la variation des techniques et des contrôles, ainsi que du manque de tests disponibles dans le commerce.[3]

Principe du test

Le système Dx GeneXpert automatise et intègre la purification d'échantillons, l'amplification d'acide nucléique et la détection de la séquence cible dans des échantillons simples ou complexes, en utilisant la RT-PCR en temps réel. Le système est composé d'un appareil, d'un ordinateur personnel et d'un logiciel pré-installé pour effectuer des tests sur des spécimens collectés et afficher les résultats. Le système requiert l'utilisation de cartouches jetables et à usage unique GeneXpert, réceptacles qui contiennent les réactifs PCR et abritent la procédure de PCR. Les problèmes de contamination croisée sont exclus car les cartouches sont indépendantes. Pour obtenir une description complète du système, consultez le *Manuel d'utilisation du système DX GeneXpert.*

Utilisé avec le système Dx GeneXpert, le dispositif BCR-ABL Xpert est conçu pour détecter la transcription de la translocation BCR-ABL et la séquence du contrôle endogène ABL dans des échantillons de sang périphérique.[15-18] En particulier, les amorces et la sonde BCR-ABL sont conçues pour détecter la translocation de la rupture BCR-ABL p210 (b2a2 et b3a2) ; les amorces et la sonde ABL sont, quant à elles, conçues pour la détection de la séquence ABL. Aucune amorce ou sonde ABL ne chevauche le site d'une mutation de kinase ABL signalée jusqu'à présent.

Pour effectuer un test, l'échantillon et les trois réactifs sont transférés dans les chambres désignées de la cartouche du dispositif BCR-ABL Xpert, la cartouche est chargée à l'intérieur de l'appareil et les informations relatives au test sont transmises au logiciel du système. Au cours du processus de test, le système Dx GeneXpert (1) déplace l'échantillon et les réactifs dans différentes chambres de la cartouche, (2) isole l'ARN complet à partir de sang total en liant l'ARN au matériau de la phase solide, (3) nettoie et débarrasse des inhibiteurs, (4) élue l'ARN, (5) hydrate les billes de réactifs et associe le mélange à de l'ARN élué, (6) déplace le mélange de l'échantillon et du réactif dans le tube de réaction, (7) réalise des contrôles qualité afin de garantir que la préparation de l'échantillon est réussie et (8) procède à des RT-PCR suivies par des PCR emboîtées en temps réel. Le processus du test pour BCR-ABL dure approximativement 2 heures et 20 minutes.

Réactifs et appareils

Matériel fourni

Le kit du dispositif BCR-ABL Xpert (BCR-100N-10) contient suffisamment de réactifs pour traiter les échantillons de 10 patients ou contrôles qualité. Le kit contient 10 tests individuels. Chaque test contient ce qui suit :

- Cartouche du dispositif BCR-ABL Xpert
  - Amorces (avant et inverse)
  - Sondes
  - dNTPs
  - Transcriptase inverse
  - Polymérase Taq
  - Tris-HCl, pH 8,6
  - HEPES, pH 7,2
  - KCl
  - $MgCl_2$
  - SAB (sérum-albumine bovin)
- Réactifs de préparation des échantillons de sang
  - Cuve pour échantillon (S)
  - Protéinase K (PK) : 50 µl
    - $CaCl_2$
    - Glycérol
    - Protéinase K
    - Tris-HCl, pH 7,5
  - Réactif de lyse (LY) : 1,8 ml
    - $CaCl_2$
    - Guanidine HCl
    - EDTA
    - SDS
    - Tris-HCl, pH 6,4
    - Tween-20
    - Urée
  - Réactif de lavage (1) : 3,3 ml
    - Éthanol
    - Guanidine thiocyanate
    - Tris-HCl, pH 7,0
  - Réactif de rinçage (2) : 1,8 ml
    - Cystéamine HCl
    - EDTA
    - KCl
    - Monothioglycerol (MTG)
    - PEG
    - Azoture de sodium
    - Tris, pH 7,0
    - Tween-20
    - Eau
  - Réactif d'élution (3) : 1,8 ml
    - Eau traitée DEPC
    - Azoture de sodium

Remarque :

- Les fiches techniques de données de sécurité (Material Safety Data Sheets, MSDS) de tous les réactifs fournis dans ce test sont disponibles sur demande auprès de l'Assistance technique de Cepheid.
- Le sérum-albumine bovin (SAB) de ce produit a été extrait exclusivement à partir de plasma bovin provenant des États-Unis. La fabrication du SAB est également réalisée aux États-Unis. Les aliments des animaux ne contenaient pas de protéine de ruminant ou d'autre protéine animale ; les animaux ont subi des tests ante et post mortem. Au cours du processus, aucun mélange ne s'est produit avec d'autres matières animales.

Stockage et manipulation

- Stockez le contenu du kit du dispositif BCR-ABL Xpert entre 2 et 8 °C.
- N'utilisez pas les réactifs ou les cartouches dont la date d'expiration est dépassée.
- N'ouvrez pas les réactifs jusqu'à leur utilisation.
- Utilisez le test du dispositif BCR-ABL Xpert dans les 30 minutes après ouverture.
- À l'exception du réactif de lyse, n'utilisez pas les réactifs qui sont devenus troubles ou décolorés.
- Si le réactif de lyse est trouble, chauffez-le à 56 °C pendant 5 minutes avant de l'utiliser.

Matériel requis mais non fourni

- Système Dx GeneXpert
- Vortex
- Microcentrifugeuse (1000 g minimum)
- Pipettes et embouts avec filtres (tailles suggérées : 200 µl et 1 000 µl)
- Éthanol 100 %
- (Facultatif) Pipettes de transfert

Remarque : La référence du système Dx GeneXpert varie en fonction de la configuration. Contactez Cepheid pour la configuration souhaitée et pour la référence correspondante.

Avertissements et précautions

- Tous les échantillons biologiques doivent être traités comme s'ils étaient susceptibles de transmettre des agents infectieux. Tous les échantillons humains doivent être traités avec des précautions identiques car il est souvent impossible de savoir lequel peut être infectieux. L'OMS (Organisation Mondiale de la Santé)[19] ou U.S. Centers for Disease Control and Prevention (Centres américains pour le contrôle et la prévention des maladies)[20] tiennent à disposition des directives concernant la manipulation des échantillons.
- Toutes les substances dangereuses doivent être éliminées conformément aux directives de sécurité de votre laboratoire.
- Ne remplacez pas les réactifs GBS Xpert par d'autres réactifs.
- Après un certain temps, l'azoture de sodium peut réagir avec le cuivre, le plomb, le laiton ou la brasure dans les plomberies pour former une accumulation de composés fortement explosifs d'azoture de plomb et d'azoture de cuivre.[21]
- Le réactif de lavage contient de la guanidine thiocyanate, qui peut former des composés hautement réactifs lorsqu'elle est combinée avec de l'eau de Javel. Si du liquide contenant ce réactif est renversé, nettoyez la zone avec du détergent de laboratoire et de l'eau.
- Ne pas suivre les procédures et les conditions décrites dans ce document et utiliser d'autres réactifs que ceux fournis dans ce kit peuvent entraîner des résultats incorrects et des effets indésirables. Par exemple, n'ajoutez pas plus d'échantillon et de réactifs que le volume requis.
- Des numérations de globules blancs excessivement élevées peuvent faire monter la pression dans la cartouche et conduire à des interruptions d'expérience.
- Faire tomber ou secouer les cartouches du dispositif BCR-ABL Xpert après avoir ajouté un échantillon et des réactifs peut entraîner le déversement de son contenu dans les mauvaises chambres, entraînant ainsi des résultats non valides. Des tubes de réaction tordus ou cassés peuvent également entraîner des résultats non valides. Ne secouez pas la cartouche et évitez de la faire tomber. Si le tube de réaction est tordu ou cassé, n'utilisez pas la cartouche.

Collecte d'échantillons et transport

Collectez des échantillons de sang périphérique conformément aux techniques standard de RT-PCR de chaque institution. Collectez des échantillons de sang dans des tubes contenant de l'EDTA ou du citrate de sodium en guise d'anticoagulant. Stockez les échantillons de sang entre 2 et 8 °C et testez-les dans les 48 heures suivant leur collecte. N'utilisez pas d'héparine en guise d'anticoagulant car cela peut inhiber la réaction PCR.

Procédure

Précautions

- Respectez les procédures de sécurité de votre laboratoire pour la manipulation de produits chimiques et d'échantillons.
- Affectez un jeu de pipettes et de réactifs exclusivement à la préparation d'échantillons. Séparez les cartouches usagées des cartouches et des réactifs non utilisés.
- Ne pas ouvrir le couvercle de la cartouche du dispositif BCR-ABL Xpert sauf pour ajouter un échantillon et des réactifs.
- Ne secouez pas la cartouche.
- Ne chargez pas une cartouche du dispositif BCR-ABL Xpert qui est tombée ou qui a été secouée après avoir inséré l'échantillon et les réactifs. Ne chargez pas une cartouche dont le tube de réaction est endommagé.
- N'ouvrez pas les cartouches usagées du dispositif BCR-ABL Xpert.
- Éliminez les cartouches usagées du dispositif BCR-ABL Xpert conformément aux directives de sécurité de votre laboratoire.

Avant de commencer

Avant de commencer la procédure, centrifugez brièvement les réactifs suivants à 1000 g pendant 10 secondes :

- Protéinase K (PK)
- Réactif de lyse (LY)
- Réactif de rinçage (2)
- Réactif d'élution (3)

Préparation de la cartouche

1. Ôtez les réactifs de préparation des échantillons du plateau scellé.
2. Ajoutez 40 µl de protéinase K (PK) à la cuve "échantillon" marquée S (vide).
3. Ajoutez 200 µl d'échantillon de sang à la cuve "échantillon" marquée S qui contient déjà la protéinase K.
4. Vortexez pendant 5 secondes.
5. Incubez à la température de la pièce pendant 1 minute.
6. Ajoutez 1 ml du réactif de lyse (LY) à la cuve "échantillon" marquée S.
7. Vortexez pendant 10 secondes.
8. Incubez à la température de la pièce pendant 10 minutes.
9. Ajoutez 1 ml d'éthanol 100 % à la cuve "échantillon" marquée S.
10. Vortexez pendant 10 secondes. Mettez de côté.
11. Ôtez une cartouche du plateau scellé.

12. Ouvrez le couvercle de la cartouche et transférez le contenu des tubes de réactifs et de la cuve "échantillon" vers les chambres de la cartouche comme suit (figure 1) :
    - **S** : pipettez le contenu entier de la cuve "échantillon" marquée S.
    - **1** : pipettez au moins 2,1 ml du contenu du tube de réactif de lavage (1).
    - **2** : pipettez au moins 1 ml du contenu du tube de réactif de rinçage (2).
    - **3** : pipettez au moins 1 ml du contenu du tube de réactif d'élution (3).
13. Fermez le couvercle de la cartouche. Assurez-vous que le couvercle se ferme bien, avec un bruit sec.

Important : Assurez-vous de charger la cartouche dans l'appareil Dx GeneXpert et de commencer le test au cours des 15 minutes suivant la préparation de la cartouche.

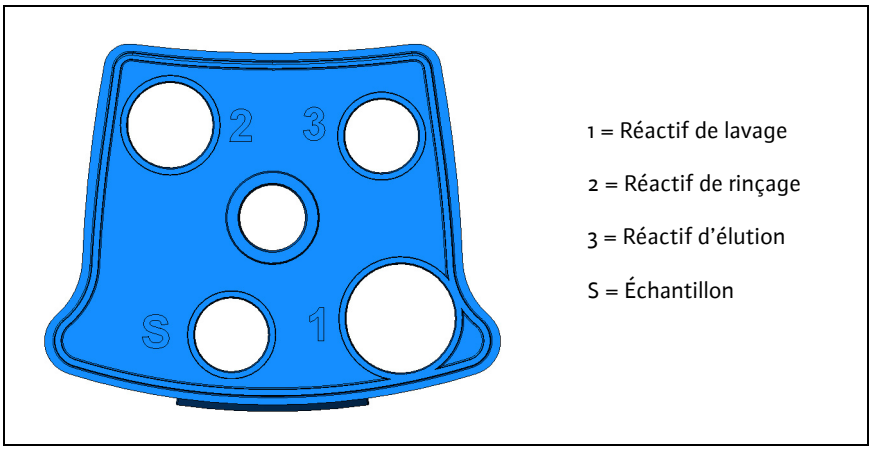

Figure 1. Chambres de la cartouches du dispositif BCR-ABL Xpert.

Réalisation du test

Cette section répertorie les étapes de base de la réalisation du test. Pour obtenir des instructions détaillées, consultez le *Manuel d'utilisation du système Dx GeneXpert.*

1. Allumez l'ordinateur, puis mettez l'appareil Dx GeneXpert sous tension.
2. Sur le bureau Windows®, double-cliquez sur l'icone de raccourci Dx GeneXpert.
3. Ouvrez une session du logiciel du système Dx GeneXpert en utilisant votre nom d'utilisateur et votre mot de passe.
4. Dans la fenêtre du système Dx GeneXpert, cliquez sur **Define Assays (Définir les tests)** et assurez-vous que la définition de tests du dispositif BCR-ABL Xpert est importée dans le logiciel. (Consultez les instructions fournies avec le CD du test). Si vous ne disposez pas du CD du dispositif BCR-ABL Xpert, contactez l'assistance technique de Cepheid.
5. Dans la fenêtre du système Dx GeneXpert, cliquez sur **Create Test (Créer le test).** La fenêtre Créer le test apparaît.
6. Scannez le code-barres de la cartouche du dispositif BCR-ABL Xpert. Le logiciel remplit automatiquement les champs suivants : **Select Assay (Sélectionnez le test), Reagent Lot ID (Numéro d'identification du lot de réactifs)** et **Expiration Date (Date limite d'utilisation).**
7. Sélectionnez le module de l'appareil.
8. Dans la case **Sample ID (Numéro d'identification de l'échantillon)**, scannez ou saisissez le numéro d'identification de l'échantillon. Assurez-vous de saisir le numéro d'identification correct de l'échantillon. Le numéro d'identification de l'échantillon est associé aux résultats du test et il est affiché dans la fenêtre **View Results (Afficher les résultats)** et dans tous les rapports.
9. Cliquez sur **Start Test (Démarrer le test).** Dans la boîte de dialogue qui apparaît, saisissez votre mot de passe.
10. Ouvrez la porte du module de l'appareil où le voyant vert clignote et chargez la cartouche. Fermez la porte. Lorsque le test est terminé, le voyant du module de l'appareil s'éteint.
11. Ouvrez la porte du module de l'appareil et ôtez la cartouche. Respectez les directives de sécurité de votre laboratoire pour éliminer la cartouche.

Affichage et impression des résultats

Pour obtenir des instructions détaillées sur la manière d'afficher et d'imprimer les résultats, consultez le *Manuel d'utilisation du système Dx GeneXpert.*

CONTROL Contrôle qualité

Chaque test comprend un contrôle endogène (ABL) et un contrôle de la sonde. Aucun contrôle externe n'est requis. Toutefois, pour un contrôle qualité supplémentaire, deux contrôles externes peuvent être réalisés une fois par mois.

- **Contrôle endogène** : normalise les cibles et garantit une quantité suffisante d'échantillon pour utiliser le test. Du fait de sa faible variabilité, le contrôle endogène peut également être utilisé pour indiquer la contamination de l'échantillon par un inhibiteur. Le contrôle endogène provient de l'échantillon.
- **Contrôle de la sonde** : vérifie la présence et l'intégrité des sondes étiquetées. L'état "Pass" de la sonde indique que les résultats du contrôle de la sonde satisfont aux critères d'acceptation.

Interprétation des résultats

C_t ABL valide

- C_t ABL doit être supérieur ou égal à 12 et inférieur ou égal à 18, avec une valeur finale de fluorescence supérieure ou égale à 200.
- Si la valeur C_t ABL est inférieure à 12, si la valeur finale de fluorescence est inférieure à 200, ou si la courbe PCR est déformée, recommencez le test, en utilisant 20 µl de l'échantillon d'origine.
- Si la valeur C_t ABL est supérieure à 18, recommencez le test avec un nouvel échantillon.

C_t BCR–ABL positif valide

- C_t BCR-ABL doit être supérieur ou égal à 12, ou il doit être inférieur ou égal à 32 avec une valeur finale de fluorescence supérieure ou égale à 40.
- Si la valeur C_t BCR-ABL est inférieure à 12, recommencez le test, en utilisant 20 µl de l'échantillon d'origine.
- Si la valeur C_t BCR-ABL est supérieure à 32, les produits de la transcription BCR-ABL ne sont pas détectés.

Résultats qualitatifs

- Toute valeur C_t BCR-ABL inférieure à 32 et qui a une valeur C_tABL valide donnera une détection positive des produits de la transcription BCR-ABL.
- Une valeur C_t BCR-ABL absente ou une valeur BCR-ABL supérieure à 32, avec un résultat ABL valide, sera désignée comme indétectable pour BCR-ABL.

Résultats quantitatifs

Un certificat d'analyse est fourni avec chaque kit du dispositif BCR-ABL Xpert ; il contient une courbe standard spécifique à un lot pour le dispositif BCR-ABL Xpert et une valeur d'efficacité ($E_{\Delta Ct}$). La courbe standard définit ΔC_t ($C_{t(ABL)}$ - $C_{t(BCR-ABL)}$) comme une fonction de la concentration d'ARN K562 dans le contexte d'un ARN de sang total normal. La valeur d'efficacité ($E_{\Delta Ct}$) est calculée à partir de la pente de la courbe standard comme suit : $E_{\Delta Ct} = 10^{(1/pente)}$.

- **Tests BCR-ABL positifs** : pour un résultat de test positif, le rapport % BCR-ABL/ ABL est calculé à l'aide de l'équation suivante. La valeur $E_{\Delta Ct}$ est obtenue à partir du certificat d'analyse spécifique à un lot qui est fourni avec le kit de test. La valeur ΔC_t test est obtenue à partir de la fenêtre Afficher les résultats ((Colonne Target Delta C_t)) du logiciel du système Dx GeneXpert (figure 2).

  rapport % BCR-ABL/ ABL = $E_{\Delta Ct}^{(\Delta Ct)} \times 100$

  Exemple

  $E_{\Delta Ct}$ spécifique à un lot = 1,915
  ΔC_t test = -2,9
  rapport % BCR-ABL/ ABL = $1,915^{(-2,9)} \times 100 = 15,195$ %

  Résultat : Positif pour BCR-ABL, détecté avec un rapport de 15,195 %

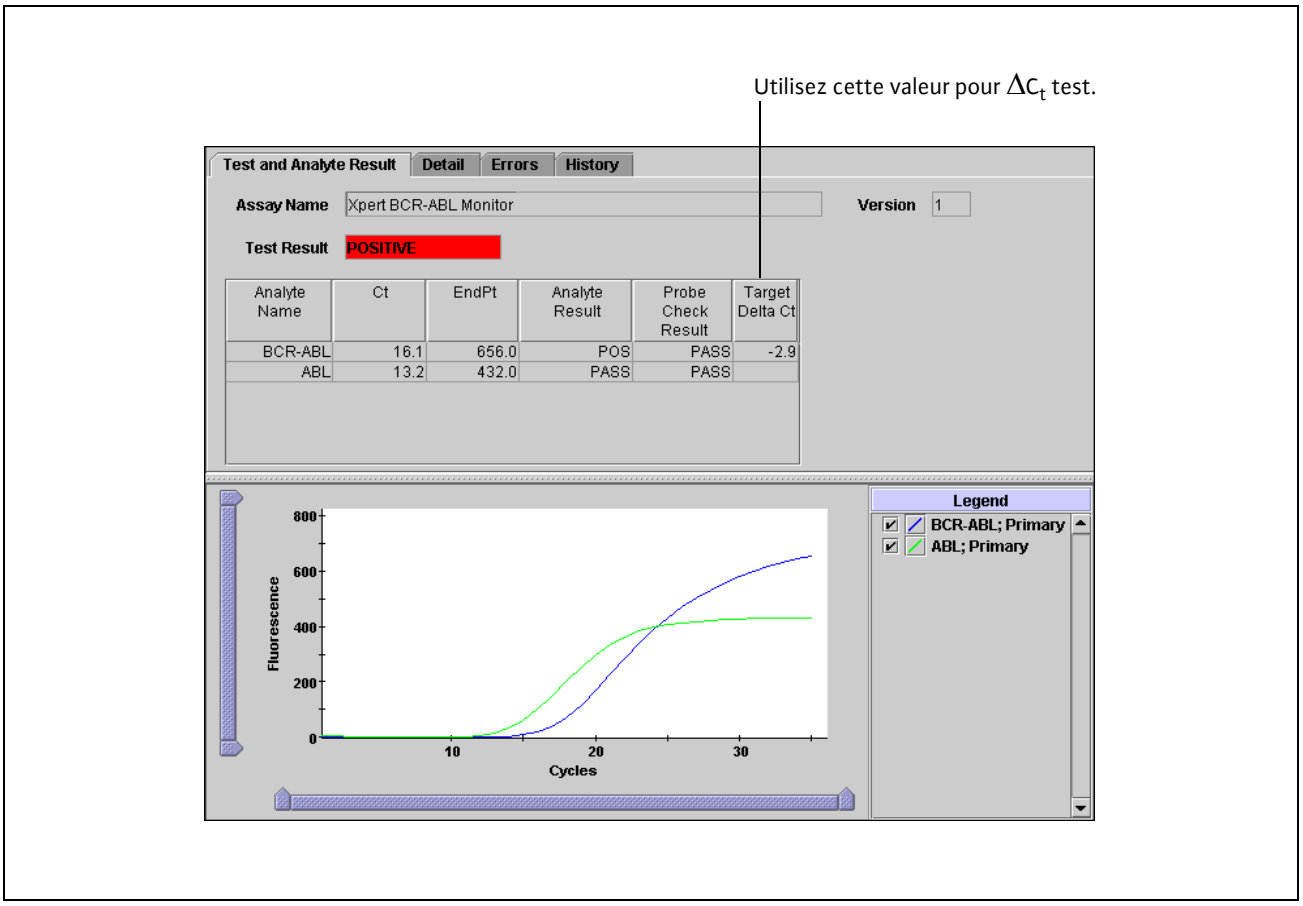

Figure 2. Système Dx GeneXpert : fenêtre View results (Afficher les résultats), résultats positifs.

- **Tests BCR-ABL négatifs** : pour des valeurs ABL supérieures à 12 mais inférieures à 18, si BCR-ABL est indétectable, calculez en premier un rapport théorique BCR-ABL avant de donner les résultats. Pour ce faire, soustrayez 32 à la valeur C_t ABL test (test ABL Ct - 32). La valeur C_t ABL est obtenue à partir de la fenêtre Afficher les résultats (Colonne Ct) du logiciel du système DX GeneXpert (figure 3). Calculez le rapport % théorique BCR-ABL. Donnez un résultat inférieur au rapport % théorique, la valeur qui doit être observée si une vraie valeur C_t BCR-ABL de 32 était mesurée.

  Exemple

  $E_{\Delta Ct}$ spécifique à un lot = 1,915
  C_t ABL test = 15,4
  Δ C_t théorique = (15,4-32) = -16,6
  Rapport % théorique BCR-ABL/ ABL = $1,915^{(-16,6)} \times 100 = 0,0021$ %

  Résultat : BCR-ABL non détectable avec une limite de détection de 0,0021 %

Si aucun BCR-ABL n'est détecté, utilisez la valeur ABL pour déterminer si des tests supplémentaires sont requis. Par exemple, si la valeur C_t ABL est supérieure à 15, la limite de détection peut être supérieure à 0,001 %. Si des niveaux faibles de BCR-ABL sont suspectés, recommencez le test. Des valeurs de C_t ABL élevées peuvent également imposer de recommencer le test.

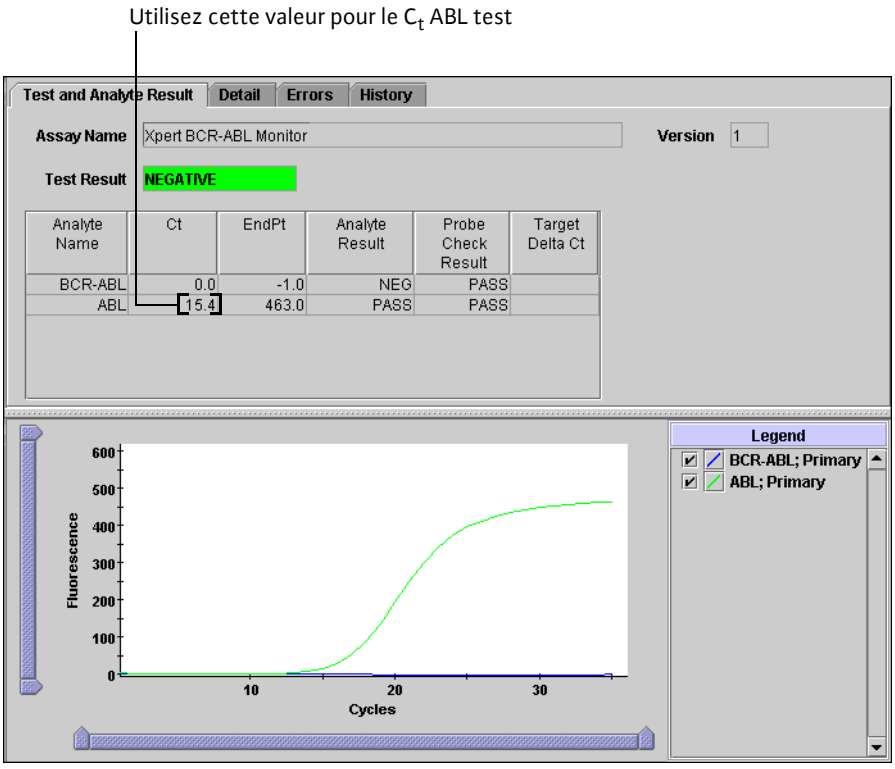

Figure 3. Système Dx GeneXpert : fenêtre View results (Afficher les résultats), résultats négatifs.

Raisons pour lesquelles le test doit être recommencé

Un résultat INVALID et/ ou ND (non déterminé) indique que l'un des contrôles ou les deux (ABL ou contrôle de la sonde) a échoué ou qu'un problème lors du process est survenu. L'expérience est non valide et doit être recommencée avec un nouvel échantillon.

Pour obtenir une description des messages d'erreur et des informations de dépannage, consultez le *Manuel d'utilisation du système DX GeneXpert*.

Restrictions

- Les performances du dispositif BCR-ABL Xpert ont été validées en utilisant uniquement les procédures fournies dans cette notice. Des modifications apportées à ces procédures peuvent modifier les performances du test.
- Les résultats donnés par le dispositif BCR-ABL Xpert doivent être interprétés conjointement avec d'autres données de laboratoire et cliniques à la disposition du clinicien.
- Le dispositif BCR-ABL Xpert ne détectera pas les translocations BCR/ABL p190 ou autres translocations qui peuvent être présents dans l'échantillon de sang périphérique d'un patient atteint de leucémie.
- Le dispositif BCR-ABL Xpert doit être lancé en utilisant du sang total traité par anticoagulant EDTA ou citrate. L'héparine ne peut pas être utilisée en guise d'anticoagulant car elle inhibe la réaction PCR.
- Chaque cartouche du dispositif BCR-ABL Xpert à usage unique est utilisée pour effectuer un seul test. Ne réutilisez pas les cartouches utilisées.

Caractéristiques des performances

Précision

La précision a été évaluée en aveugle, au cours d'une étude comparative sur trois sites, en utilisant quatre échantillons présentant des concentrations différentes de BCR/ ABL. Au total 240 échantillons ont été étudiés. L'étude des spécimens comprend quatre niveaux d'échantillon : négatif et 3 niveaux d'ARN BCR-ABL faible, modéré ou élevé. Ces échantillons ont été préparés en utilisant du sang total (collecté avec du citrate anticoagulant) à partir de donneurs normaux en bonne santé avec un ajout de différents volumes d'ARN K562 (référence Ambion n° 7832) après la lyse des échantillons de sang. Chaque site a reçu un total de 80 échantillons, composés de lots de 20 échantillons de chacun des 4 niveaux. Les échantillons ont été analysés au cours de 20 expériences de quatre échantillons, à raison de quatre expériences par jour pendant cinq jours. Quatre échantillons, un échantillon issu de chaque niveau, ont été inclus dans chaque expérience. Deux techniciens provenant de chaque site ont participé à l'étude, chacun effectuant deux expériences de quatre échantillons chacune par jour. Le GeneXpert a déterminé le niveau de BCR/ ABL de chaque échantillon. La précision a été estimée en accord avec la directive CLSI pour l'évaluation des performances de la précision des appareils à usage chimique en clinique.[22]

Table 1. Précision des tests.

Site	Échantillon	N	% moy. BCR-ABL/ ABL	% BCR-ABL/ ABL Dév. Std	95 % CI	% CV
1	BCR-ABL négatif	20	< 0.000133% (négatif)	—	—	—
2	BCR-ABL négatif	20	< 0.000175% (négatif)	—	—	—
3	BCR-ABL négatif	20	< 0.000163% (négatif)	—	—	—
Total	BCR-ABL négatif	60	< 0.000157% (négatif)	—	—	—
1	BCR-ABL faible	20	0.00477%	0.00477%	0.00218 – 0.00737%	100.0%
2	BCR-ABL faible	19	0.00285%	0.00285%	0.00125 – 0.00445%	100.0%
3	BCR-ABL faible	20	0.00528%	0.00528%	0.00241 – 0.00815%	100.0%
Total	BCR-ABL faible	59	0.00430%	0.00524%	0.00273 – 0.00587%	121.8%
1	BCR-ABL modéré	20	1.003%	0.324%	0.827 – 1.179%	32.3%
2	BCR-ABL modéré	20	0.856%	0.427%	0.624 – 1.088%	49.8%
3	BCR-ABL modéré	19	1.005%	0.433%	0.762 – 1.248%	43.1%
Total	BCR-ABL modéré	59	0.954%	0.397%	0.835 – 1.073%	41.6%
1	BCR-ABL haut	20	12.18%	2.40%	10.88 – 13.49%	19.7%
2	BCR-ABL haut	20	12.34%	7.31%	8.36 – 16.32%	59.2%
3	BCR-ABL haut	20	12.18%	4.10%	9.95 – 14.41%	33.7%
Total	BCR-ABL haut	60	12.24%	5.03%	10.74–13.73%	41.1%

Performances cliniques :

Les performances du test ont été évaluées sur trois sites en utilisant une collection de 46 échantillons provenant de patients atteints de LMC. Les deux sites ont également effectué un test développé dans leur laboratoire pour comparaison. Les données ont été regroupées en trois catégories :

- Négatif (<0,01 % BCR-ABL détecté)
- Faiblement positif (0,01 % à 0,05 % BCR-ABL détecté)
- Haut positif (>0,05 % BCR-ABL détecté)

Table 2. Résultats du test

Résultats du test	Nombre d'échantillons LMC
Négatif par les deux méthodes	17
Négatif par la méthode développée en laboratoire mais faible positif par GeneXpert	3
Faible positif par les deux méthodes	8
Haut positif par les deux méthodes	18

Accord des résultats négatifs : 17/20 = 85%
Accord des résultats positifs : 26/26 = 100%

Spécificité

La spécificité du test a été évaluée en utilisant 44 échantillons de sang normal citraté et EDTA provenant de quartre sites. Tous les échantillons normaux ont été négatifs pour BCR-ABL, donnant une spécificité de 100 %.

La spécificité du test a également été évaluée sur trois sites en utilisant une collection de 12 échantillons de sang provenant de patients atteints d'autres syndromes hématologique, comprenant la leucémie aigue myéloblastique, la leucémie aigue lymphoblastique, le lymphome Hodgkinien, le myélome multiple et le lymphome folliculaire. Tous ces échantillons ont été négatifs pour BCR-ABL, donnant une spécificité de 100 %.

Limite de détection et de linéarité

La Figure 4 affiche les données de la limite de détection et de linéarité générées à partir d'une expérience unique de 44 cartouches. La procédure décrite dans cette notice a été utilisée avec les exceptions suivantes : Une série de dilution d'ARN total de leucémie (K562) d'Ambion (référence 7832) a été étudiée en solution dans du sang citraté après que de l'éthanol ait été ajouté à la cuve "échantillon". Quatre réplicats ont été effectués pour chaque concentration d'ARN avec les exceptions suivantes : six réplicats ont été effectués pour des échantillons de 30 pg et 10 pg.

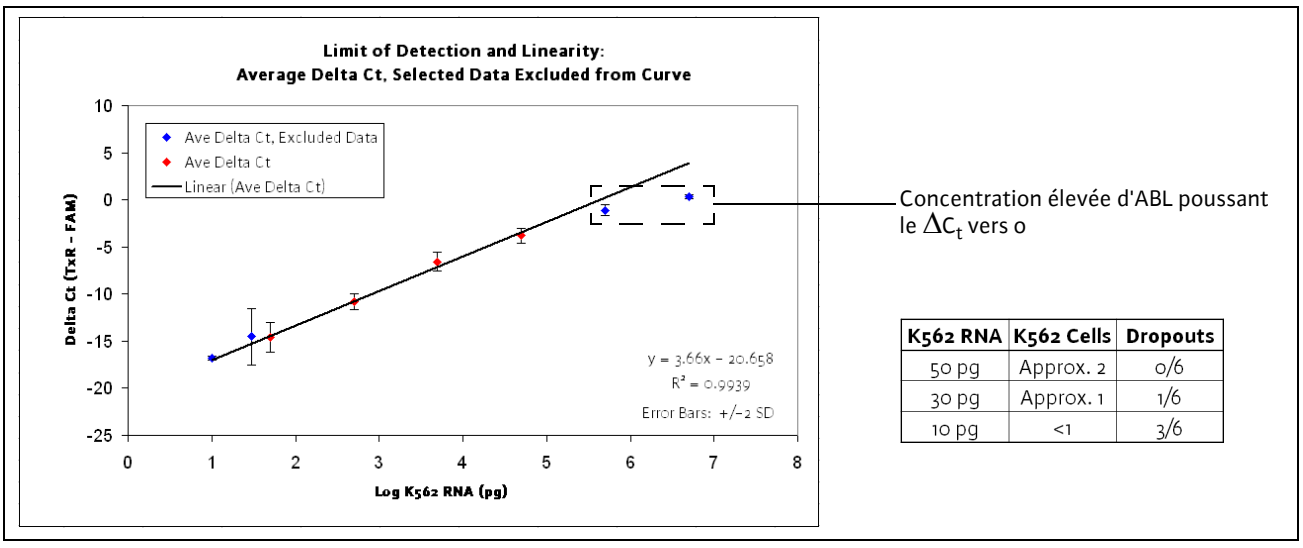
Limit of Detection and Linearity:
Average Delta Ct, Selected Data Excluded from Curve
Ave Delta Ct, Excluded Data
Ave Delta Ct
Linear (Ave Delta Ct)
Delta Ct (TxR - FAM)
Log K562 RNA (pg)
y = 3.66x - 20.658
R² = 0.9939
Error Bars: +/-2 SD
Concentration élevée d'ABL poussant le ΔCt vers o
K562 RNA | K562 Cells | Dropouts
50 pg | Approx. 2 | 0/6
30 pg | Approx. 1 | 1/6
10 pg | <1 | 3/6

Figure 4. Limite de données de détection de linéarité.

Références

[1] Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer Statistics 2005. CA Cancer J Clin. 2005;55:10-30.

[2] Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. Nature. 1973;243:290-293.

[3] NCCN. Clinical Practice Guidelines in Oncology; Chronic Myelogenous Leukemia. Version 1. 2006.

[4] Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. Blood. 2005;105(7):2640-2653.

[5] Kantarjian HM, Talpaz M, Cortes J, et al. Quantitative polymerase chain reaction monitoring of BCR-ABL during therapy with imatinib mesylate (STI571;Gleevec) in chronic-phase chronic myelogenous leukemia. Clin Cancer Res. 2003;9(1):160-6.

[6] Gabert J et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia-A Europe Against Cancer Program. Leukemia 2003;1-40.

[7] Sawyers C. Chronic Myeloid Leukemia. NEJM. 1999;340(17):1330-40.

[8] Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood. 2000;96(10):3343-56.

[9] Goldman JM, Kaeda JS, Cross NC. Clinical decision making in chronic myeloid leukemia based on polymerase chain reaction analysis of minimal residual disease. Blood. 1999;94(4):1484-6.

[10] Radich JP. The detection and significance of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia. Medicina (B Aires) 2000;60 Suppl 2:66-70.

[11] Hochhaus A, Reiter A, Skladny H, et al. Molecular monitoring of residual disease in chronic myelogenous leukemia patients after therapy. Recent Results Cancer Res 1998;144:36-45.

[12] Hochhaus A, Reiter A, Saussele S, et al. Molecular heterogeneity in complete cytogenetic responders after interferon-alpha therapy for chronic myelogenous leukemia: low levels of minimal residual disease are associated with continuing remission. German CML Study Group and the UK MRC CML Study Group. Blood. 2000;95(1):62-6.

[13] Radich JP, Gehly G, Gooley T, et al. Polymerase chain reaction detection of the BCR-ABL fusion transcript after allogeneic marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: results and implications in 346 patients. Blood 1995;85(9):2632-8.

[14] Olavarria E, Kanfer E, Szydlo R, et al. Early detection of BCR-ABL transcripts by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction predicts outcome after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. Blood. 2001;97(6):1560-5.

[15] Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer Program. Leukemia. 2003;17:2318-2357.

[16] Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) - a Europe Against Cancer Program. Leukemia. 2003;17:2474-2486.

[17] van der Velden VH, Boeckx N, Gonzalez M, et al. Differential stability of control gene and fusion gene transcripts over time may hamper accurate quantification of minimal residual disease--a study within the Europe Against Cancer Program. Leukemia. 2004;18:884-886.

[18] van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. Leukemia. 2003;17:1013-1034.

[19] World Health Organization. Guidelines on Standard Operating Procedures for HAEMATOLOGY, from http://w3.whosea.org/EN/Section10/Section17/Section53.htm.

[20] U.S. Centers for Disease Control. Morbidity and Mortality Weekly Review. 1987;36(suppl. 2S):2S-18S.

[21] NIOSH Publication No. 2005-151: NIOSH Pocket Guide to Chemical Hazards, September 2005.

[22] CLSI. Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline. CLSI document EP5-A (ISBN 1-56238-368-X). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898, USA, 1999.

Notification de brevet à l'acheteur

L'achat de ce produit permet à l'acheteur de l'utiliser pour l'exécution des services diagnostics pour les diagnostics *in vitro* humains. Aucun brevet général ou aucune autre licence de quelque sorte que ce soit en dehors du présent droit spécifique d'utilisation n'est accordé(e).

Assistance

Pour bénéficier d'une assistance, contactez Cepheid en utilisant l'une des informations relatives aux contacts suivantes. Assurez-vous de communiquer le numéro de série de l'appareil et le numéro d'identification du lot d'agents réactifs lorsque vous appelez ou envoyez un courrier électronique.

Amérique du Nord

Pour bénéficier d'une assistance technique, utilisez les informations relatives aux contacts suivantes :

Tél. : +1.888.838.3222
Courrier électronique : techsupport@cepheid.com

Vous pouvez joindre l'assistance technique de Cepheid par téléphone du lundi au vendredi, de 6h00 à 17h00, heure du Pacifique.

Union européenne

Pour bénéficier d'une assistance technique, utilisez les informations relatives aux contacts suivantes :

Tél. : +33.563.82.53.19
Courrier électronique : techsupport@cepheideurope.fr

Autres sites

Contactez votre représentant local Cepheid.

Tableau des symboles

Pictogrammes	Signification
	Référence
	Appareil à usage médical de diagnostic *in vitro*
	À ne pas réutiliser
	Fabricant
	Contenu suffisant pour <n> tests
	Contrôle
	Mandataire de la Communauté européenne
	Limitation de la température
	Risque biologique

Fabricant

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089-1189

Tél. : +1.408.541.4191
Télécopie : +1.408.541.4192

EC REP Représentant agréé

Cepheid Europe
Vira-Solelh
81470 Maurens-Scopont
France

Tél. : +33.563.82.53.00
Télécopie : +33.563.82.53.01
Courrier électronique : cepheid@cepheideurope.fr

CE IVD

Février 2006

Deutsch

Medizinisches *In Vitro*-Diagnostikgerät

Markenname

Xpert BCR-ABL-Monitor™

Üblicher Name

Xpert BCR-ABL-Monitor

Verwendungszweck

Der Xpert BCR-ABL-Monitor ist zur Erfassung BCR-ABL-chromosomaler Translokationen vorgesehen und stellt eine Echtzeit-RT-PCR-Untersuchung (RT=Reverse Transkription, PCR=Polymerase-Kettenreaktion) dar. Er dient zur Überwachung des p210 (b2a2 und b3a2)-Transkripts in peripheren Blutlymphozyten (PBL) von Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML). Eine signifikante Zunahme des p210-Transkripts sollte durch ein anderes Verfahren bestätigt werden, wie z. B. einer zytogenetischen Metaphasen-Standardanalyse einer Knochenmarksprobe des Patienten.

Zusammenfassung und Erklärung

Die chronische myeloische Leukämie (CML) gehört zu einer Gruppe von Erkrankungen, die als myeloproliferative Erkrankungen bezeichnet werden. Im Jahr 2005 betrug die Zahl der Neuerkrankungen schätzungsweise 4600, die Zahl der Todesfälle 850.[1] Über 95 % der Patienten mit CML besitzen das verkürzte Philadelphia-Chromosom (Ph1), das aus einer reziproken Translokation zwischen den langen Armen der Chromosomen 9 und 22 stammt. Im Verlauf dieser Translokation wird das ABL-Gen (Abelson) von Chromosom 9 auf den BCR-Bereich (BCR; Breakpoint Cluster Region) von Chromosom 22 transferiert, was zur Entstehung des Fusionsgens BCR-ABL führt.[2, 4] Dieses Fusionsgen produziert das Protein p210 (b2a2 und b3a2). Hierbei handelt es sich um eine Tyrosinkinase mit deregulierter Aktivität, die eine Schlüsselrolle in der Entwicklung von CML spielt.[3]

Die aktuellen Richtlinien der EAC (Europe Against Cancer) und der NCCN (National Comprehensive Cancer Network) für die Behandlung von Patienten mit CML fordern den Einsatz des RT-PCR-Verfahrens bei der ersten medizinischen Untersuchung von Patienten mit CML im chronischen Stadium, bei Kontrolluntersuchungen auf minimale Resterkrankung und bei der Bestimmung von Patienten, bei denen ein hohes Rückfallrisiko bestehen könnte.[3, 15] RT-PCR ist erwiesenermaßen ein präzises und hochempfindliches Verfahren zum Nachweis des BCR-ABL-Fusionsgens[3-14] und empfindlicher als FISH (Fluoreszenz-In Situ-Hybridisierung) oder Zytogenetik.[3] Ein weiterer Vorteil der quantitativen PCR gegenüber FISH und Zytogenetik ist die hohe Korrelation der PCR-Ergebnisse aus Knochenmark und peripheren Blutproben.[3, 15] Mit dem PCR-Verfahren könnte möglicherweise die Zahl der Knochenmarkaspirationen verringert werden, welche bei Patienten mit CML erforderlich sind. Obgleich das quantitative PCR-Verfahren aller Voraussicht nach standardmäßig zur Kontrolle von minimalen Resterkrankungen eingesetzt werden wird, ist es aufgrund unterschiedlicher Techniken und Kontrollen sowie kommerziell nicht erhältlicher Untersuchungen derzeit nicht flächendeckend verfügbar.[3]

Prinzipien der Prozedur

Das GeneXpert Dx-System automatisiert und integriert die Probenvorbereitung, die Amplifizierung von Nukleinsäuren und die Detektion der Zielsequenz in einfachen und komplexen Proben mittels Echtzeit-RT-PCR. Das System besteht aus einem Instrument und einem PC mit vorinstallierter Software, die zur Ausführung von Tests an gesammelten Proben und zur Anzeige der Ergebnisse dient. Es ist die Verwendung von GeneXpert-Einwegkartuschen erforderlich, also den Behältern, die die PCR-Reagenzien enthalten und in denen der PCR-Prozess abläuft. Da die Kartuschen in sich abgeschlossen sind, werden Kreuzkontaminationen verhindert. Für eine vollständige Beschreibung des Systems siehe das *Benutzerhandbuch zum GeneXpert Dx-System.*

Der Xpert BCR-ABL-Monitor ist zusammen mit dem GeneXpert Dx-System für den Nachweis des BCR-ABL-Translokationstranskripts und der endogenen ABL-Kontrollsequenz in peripheren Blutproben ausgelegt.[15-18] Die BCR-ABL-Primer und die -Sonde sind speziell zum Nachweis der BCR-ABL p210 (b2a2 und b3a2)-Major Breakpoint-Translokation ausgelegt, die ABL-Primer und –Sonde zum Nachweis der ABL-Sequenz. Eine Überlappung der ABL Primer oder -Sondensequenz mit einer ABL Kinasemutation ist bis heute nicht beschrieben worden.

Zur Durchführung eines Tests werden die Probenmischung und drei Reagenzien in vorbezeichnete Kammern der Xpert BCR-ABL-Monitorkartusche gegeben. Anschließend wird die Kartusche in das Instrument geladen und die Testinformation an die Systemsoftware übertragen. Während des Tests platziert das GeneXpert Dx-System (1) die Probe und die Reagenzkügelchen in verschiedene Kammern der Kassette, (2) isoliert die gesamte RNA des Vollbluts durch Bindung an die feste Phase, (3) wäscht und spült Inhibitoren aus, (4) eluiert die RNA, (5) hydriert die Reagenzkügelchen und kombiniert die Mischung mit der eluierten RNA, (6), gibt die Probe und Reagenzmischung in das Reagenzglas, (7) führt Qualitätskontrollen durch, um sicherzustellen, dass die Probenzubereitung erfolgreich war und (8) führt eine Echtzeit-RT-PCR durch, gefolgt von einer verschachtelten PCR. Das Testverfahren auf BCR-ABL dauert ungefähr 2 Stunden und 20 Minuten.

Reagenzien und Instrumente

Im Lieferumfang enthaltenes Material

Das Xpert BCR-ABL-Monitor-Kit (BCR-100N-10) enthält Reagenzien zur Verarbeitung von 10 Patienten- oder Qualitätskontrollproben. Das Kit enthält 10 individuelle Untersuchungspackungen. Jede Untersuchungspackung enthält folgendes:

- Xpert BCR-ABL-Monitorkartusche
  - Primer (vorwärts und rückwärts)
  - Sonden
  - dNTPs
  - Reverse Transkriptase
  - Tag-Polymerase
  - Tris-HCl, pH 8,6
  - HEPES, pH 7,2
  - KCl
  - $MgCl_2$
  - BSA (Bovine Serum Albumin)
- Blutproben-Präparationsreagenzien
  - Probenbehälter (S)
  - Proteinase K (PK) – 50 µl
    - $CaCl_2$
    - Glyzerin
    - Proteinase K
    - Tris-HCl, pH 7,5
  - Lysereagenz (LY) – 1,8 ml
    - $CaCl_2$
    - Guanidin-HCl
    - EDTA
    - SDS
    - Tris-HCl, pH 6.4
    - Tween-20
    - Harnstoff
  - Waschreagenz (1) – 3,3 ml
    - Ethanol
    - Guanidin-Thiocyanat
    - Tris-HCl, pH 7,0
  - Spülreagenz (2) – 1,8 ml
    - Cysteamin-HCl
    - EDTA
    - KCl
    - Monothioglyzerin (MTG)
    - PEG
    - Natriumazid
    - Tris, pH 7,0
    - Tween 20
    - Wasser
  - Elutionsreagenz (3) – 1,8 ml
    - DEPC-behandeltes Wasser
    - Natriumazid

Hinweis:

- Für alle Reagenzien dieser Untersuchung sind über den Technischen Support Sicherheitsdatenblätter erhältlich.
- Das BSA (Bovine Serum Albumin) in diesem Produkt wurde ausschließlich aus bovinem Plasma hergestellt, das aus den USA stammt. Auch die Herstellung des BSA erfolgte in den USA. Die Tiere erhielten keinerlei Wiederkäuer- oder anderes Tierprotein mit dem Futter und wurden ante- und post-mortem Tests unterzogen. Bei der Verarbeitung wurde das Material nicht mit anderen Tiermaterialien vermischt.

Lagerung und Handhabung

- Den Inhalt des Xpert BCR-ABL-Monitor-Kits bei 2–8 °C lagern.
- Reagenzien und Kartuschen, die das Verfallsdatum überschritten haben, dürfen nicht verwendet werden.
- Die Reagenzien erst öffnen, wenn sie verwendet werden.
- Die Xpert BCR-ABL Monitor-Untersuchungspackung innerhalb von 30 Minuten nach Öffnen verwenden.
- Mit Ausnahme des Lysereagenz keine Reagenzien verwenden, die trübe oder farblos geworden sind.
- Wenn das Lysereagenz trübe ist, vor Verwendung 5 Minuten bei 56 °C erwärmen.

Materialien die nicht im Lieferumfang enthalten sind

- GeneXpert Dx-System
- Vortexer
- Mikrozentrifuge (mindestens 1000 g)
- Pipetten und Aerosolfilter-Pipettenspitzen (empfohlene Größen: 200 µl and 1000 µl)
- 100 % Ethanol
- (Optionale) Transferpipetten

Hinweis: Die Katalognummer des GeneXpert Dx-Systems hängt von der Konfiguration ab. Setzen Sie sich mit Cepheid in Verbindung, um die gewünschte Konfiguration und entsprechende Katalognummer zu erfahren.

Warnungen und Vorsichtshinweise

- Alle biologischen Proben sind als infektiös zu behandeln. Da es oft unmöglich ist, zu bestimmen, welche Probe infektiös ist, sollten alle Proben vom Menschen mit den üblichen Sorgfaltsmaßnahmen behandelt werden. Richtlinien zur Handhabung von Proben sind erhältlich bei der WHO oder bei der CDC (Center of Disease Control).[20]
- Entsorgen Sie alle gefährlichen Materialien gemäß der Sicherheitsrichtlinien Ihres Labors.
- Ersetzen Sie Xpert GBS-Reagenzien nicht durch andere Reagenzien.
- Über eine längere Zeitdauer kann Natriumazid mit Kupfer, Blei, Messing oder Lotmetall aus Rohrleitungen reagieren und sich als hochexplosiver Bestandteil von Blei- und Kupferazid ansammeln.[21]
- Das Waschreagenz enthält Guanidin-Thiocyanat, welches hochreaktive Komponenten bilden kann, wenn es mit Bleichmittel vermischt wird. Sollten Flüssigkeiten verschüttet werden, die dieses Reagenz enthalten, reinigen Sie den Bereich mit Laborreinigungsmitteln und Wasser.
- Nichtbeachtung der in diesem Dokument beschriebenen Verfahrensweisen und Bedingungen sowie die Verwendung von anderen Reagenzien, die nicht im Kit enthalten sind, kann zu falschen Ergebnissen führen und negative Folgen haben. Beispielsweise sollten Sie nicht mehr Proben und Reagenzien hinzufügen als erforderlich.
- Eine überhöhte Zahl an weißen Blutzellen kann zu einem Druckaufbau in der Kartusche und zum Abbruch von Läufen führen.
- Nach Hinzufügen der Probe und Reagenzien kann der Behälterinhalt in die falschen Kammern gelangen und somit zu ungültigen Ergebnissen führen,wenn die Xpert BCR-ABL Monitorkartusche herunterfällt oder geschüttelt wird. Auch verbogene oder beschädigte Reaktionsgefäße können ungültige Ergebnisse hervorrufen. Kartusche nicht schütteln oder fallen lassen. Die Kartusche nicht verwenden falls zerbrochen oder verbogen zerbrochen oder verbogen.

Probensammlung und –transport

Periphere Blutproben sammeln gemäß den Richtlinien der einzelnen Institutionen für RT-PCR. Blutproben in Röhrchen sammeln, die EDTA oder Natriumcitrat als Antikoagulanz enthalten. Blutproben bei 2–8 °C lagern und innerhalb von 48 Stunden nach der Entnahme testen. Heparin nicht als Antikoagulanz verwenden, da es die PCR-Reaktion hemmen kann.

Prozedur

Vorsichtshinweise

- Halten Sie sich an die Sicherheitsprozeduren Ihres Labors für den Umgang mit Chemikalien und der Handhabung von Proben.
- Bestimmen Sie 1 Pipetten- und Reagenziensatz für die Probenvorbereitung. Trennen Sie gebrauchte Kartuschen von ungebrauchten Kartuschen und Reagenzien.
- Öffnen Sie den Xpert BCR-ABL Monitorkartuschendeckel nur, um Proben- und Reagenzien hinzuzufügen.
- Schütteln Sie die Kartusche nicht.
- Laden Sie keine Xpert BCR-ABL-Monitorkartusche, die hinuntergefallen ist oder geschüttelt wurde. Laden Sie keine Kartusche, die beschädigt ist.
- Öffnen Sie die Xpert BCR-ABL-Monitorkartusche nicht.
- Entsorgen Sie die Xpert BCR-ABL-Monitorkartusche gemäß der Sicherheitsrichtlinien Ihres Labors.

Bevor Sie beginnen

Bevor Sie mit der Prozedur beginnen: zentrifugieren Sie die folgenden Reagenzien bei 1000 g für 10 Sekunden.

- Proteinase K (PK)
- Lysereagenz (LY)
- Spülreagenz (2)
- Elutionsreagenz (3)

Vorbereiten der Kartusche

1. Reagenzien zur Probenvorbereitung aus der versiegelten Schale nehmen.
2. 40 µl Proteinase K (PK) in den leeren und mit „S“ markierten 5-ml Probenbehälter pipettieren.
3. In den Probenbehälter (S), der bereits Proteinase K enthält, 200 µl der Blutprobe pipettieren.
4. 5 Sekunden vortexen.
5. 1 Minute Inkubation bei Raumtemperatur.
6. 1 ml Lysereagenz (LY) in den Probenbehälter pipettieren.
7. 10 Sekunden vortexen.
8. 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur.
9. In den Probenbehälter (S) 1 ml 100% Ethanol pipettieren.
10. 10 Sekunden vortexen. Den Probenbehälter zur Seite stellen.
11. Eine Kartusche aus der versiegelten Schale entnehmen.

12. Den Kartuschendeckel, und die Inhalte aus den Reagenzgefäßen und dem Probenbehälter entnehmen und wie folgt in die Kartuschenkammern füllen (Abbildung 1):
    - **S** – den gesamten Inhalt in den Probenbehälter (S) pipettieren.
    - **1** – mindestens 2,1 ml des Inhalts aus dem Waschreagenzröhrchen (1) pipettieren.
    - **2** – mindestens 1 ml des Inhalts aus dem Spülreagenzröhrchen (2) pipettieren.
    - **3** – mindestens 1 ml des Inhalts aus dem Elutionsreagenzröhrchen (3) pipettieren.
13. Den Kartuschendeckel schließen und sicherstellen, daß der Deckel fest eingerastet ist.

Wichtig: Sicher stellen, daß die Kartusche in das GeneXpert Dx-Instrument geladen ist und den Test innerhalb von 15 Minuten nach Vorbereitung der Kartusche starten.

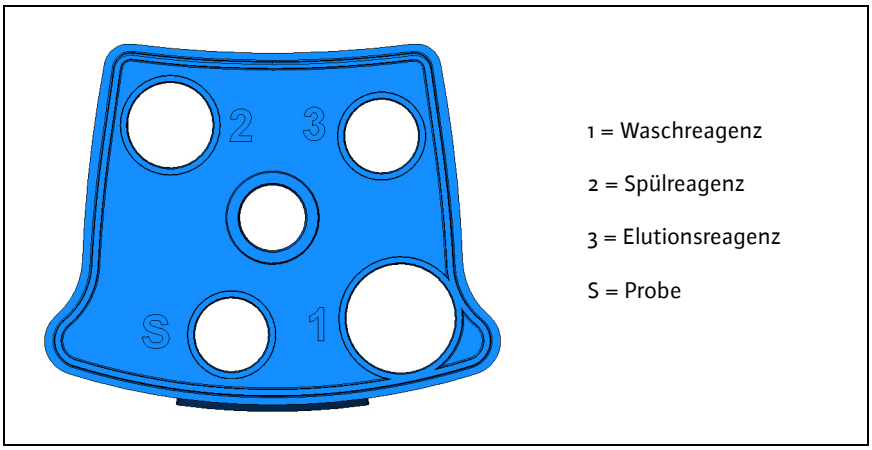

Abbildung 1. Xpert BCR-ABL-Monitorkassettenkammern.

Testdurchführung

In diesem Abschnitt werden die Grundschritte der Testausführung beschrieben. Für genauere Anweisungen das *Benutzerhandbuch zum GeneXpert Dx-System* verwenden.

1. Den Computer und anschließend das GeneXpert Dx-Instrument einschalten.
2. Doppelklick auf dem Windows®-Desktop auf das Symbol GeneXpert Dx.
3. Mit Ihrem Benutzernamen und Kennwort bei der GeneXpert Dx-Systemsoftware anmelden.
4. Im Fenster des GeneXpert Dx-Systems auf **Define Assays (Untersuchungen definieren)** klicken und sicherstellen, dass die Xpert BCR-ABL-Monitor-Untersuchung in die Software importiert wird. (Siehe dazu die Hinweise auf der Untersuchungs-CD.) Sollte kein Xpert BCR-ABL-Monitor-CD zur Verfügung stehen den Technischen Support anrufen.
5. Im Fenster **GeneXpert Dx System** auf **Create Test (Test erstellen)** klicken. Das Fenster **Create Test (Test erstellen)** wird geöffnet.
6. Den Strichcode der Xpert BCR-ABL-Monitorkartusche einscannen. Folgende Felder der Software werden automatisch ausgefüllt: **Select Assay (Untersuchung auswählen)**, **Reagent Lot ID (Reagenzienchargen-ID)** und **Expiration Date (Verfallsdatum)**.
7. Das Instrumentenmodul auswählen.
8. Die **Sample ID (Proben-ID)** in das Feld eintippen oder scannen. Die Proben-ID hängt mit den Testergebnissen zusammen und wird im Fenster **View Results (Ergebnisse anzeigen)** und in allen Berichten angezeigt.
9. Auf **Start Test (Test starten)** klicken. Kennwort in das angezeigte Dialogfeld eingeben.
10. Die Tür des Instrumentenmoduls mit der grünen blinkenden Anzeige öffnen und die Kartusche laden. Tür schließen. Wenn der Test abgeschlossen ist, erlischt die Anzeige des Instrumentenmoduls.
11. Die Tür des Instrumentenmoduls öffnen und die Kartusche entnehmen. Bei der Entsorgung der Kartusche die Sicherheitsrichtlinien des Labors beachten.

Anzeigen und Drucken der Ergebnisse

Siehe das *Benutzerhandbuch zum GeneXpert Dx-System* für genaue Informationen über das Anzeigen und Drucken der Ergebnisse.

CONTROL Qualitätskontrolle

Jeder Test umfasst eine endogene Kontrolle (ABL) und eine Sondenprüfungskontrolle. Es sind keine externen Kontrollen erforderlich. Für zusätzliche Qualitätskontrollen können jedoch einmal pro Monat externe Kontrollen getestet werden.

- **Endogene Kontrolle** – Normalisiert Zielsequenzen und stellt sicher, dass beim Test eine ausreichende Probenmenge verwendet wurde. Aufgrund ihrer geringen Variabilität kann die endogene Kontrolle auch zum Nachweis einer Verschmutzung der Probe mit Hemmstoffen eingesetzt werden. Die endogene Kontrolle wird der Objektprobe entnommen.
- **Sondenprüfung** – Dabei werden Vorhandensein und Integrität der markierten Sonden überprüft. Lautet der Status des Sondentests $^{\text{Pass}}$ (Bestanden), bedeutet dies, dass die Ergebnisse des Sondentests die Akzeptanzkriterien erfüllen.

Interpretation der Ergebnisse

Gültige ABL C_t

- ABL C_t muss mindestens 12 oder maximal 18 betragen, wobei der Endpunktwert mindestens 200 sein muss.
- Beträgt der ABL C_t-Wert weniger als 12, der Endpunkt weniger als 200 oder ist die PCR-Kurve deformiert, den Test mit 20 µl der Originalprobe wiederholen.
- Ist der ABL C_t-Wert größer als 18, den Test mit einer frischen Probe wiederholen.

Gültige positive BCR-ABL C_t

- ABL C_t muss mindestens 12 oder maximal 32 betragen, wobei der Endpunkt mindestens 40 sein muss.
- Wenn der BCR-ABL C_t-Wert weniger als 12 beträgt, den Test mit 20 µl der Originalprobe wiederholen.
- Ist der BCR-ABL C_t-Wert größer als 32, werden die BCR-ABL-Transkripte nicht nachgewiesen.

Qualitative Ergebnisse

- Jeder BCR-ABL C_t-Wert unter 32 mit einem gültigen ABL C_t-Wert führt zu einem positiven Nachweis von BCR-ABL-Transkripten.
- Das Fehlen eines BCR-ABL C_t-Werts oder ein BCR-ABL-Werts über 32 zusammen mit einem gültigen ABL-Wert wird für BCR-ABL als nicht nachweisbar bezeichnet.

Quantitative Ergebnisse

Im Lieferumfang aller Xpert BCR-ABL-Monitore ist ein Analysezertifikat enthalten, das eine chargenspezifische Standardkurve für den Xpert BCR-ABL-Monitor und einen Effizienzwert ($E_{\Delta Ct}$) enthält. Die Standardkurve ergibt ΔC_t ($C_{t(ABL)}$ - $C_{t(BCR-ABL)}$) als eine Funktion der K562 RNA-Konzentration auf dem Hintergrund normaler Vollblut-RNA. Der Effizienzwert ($E_{\Delta Ct}$) wird wie folgt aus der Steigung der Standardkurve berechnet: $E_{\Delta Ct} = 10^{(1/\text{Steigung})}$.

- **BCR-ABL-positive Tests** – Für ein positives Testergebnis wird das Prozentverhältnis BCR-ABL/ABL anhand der folgenden Gleichung berechnet:
  Der $E_{\Delta Ct}$-Wert wird dem chargenspezifischen Analysezertifikat entnommen, das im Lieferumfang des Untersuchungs-Kits enthalten ist. Der Test ΔC_t -Wert wird entnommen dem Fenster View Results (Ergebnisse anzeigen) (Zielspalte Delta Ct) der GeneXpert Dx Systemsoftware (figure 2).

  Prozentverhältnis BCR-ABL/ABL = $E_{\Delta Ct}^{(\Delta Ct)} \times 100$

  Beispiel

  Chargenspezifischer $E_{\Delta Ct} = 1{,}915$
  Test $\Delta C_t = -2{,}9$
  Prozentverhältnis BCR-ABL/ABL = $1{,}915^{(-2{,}9)} \times 100 = 15{,}195\ \%$

  Ergebnis: Positiv auf BCR-ABL, ermittelt bei einem Verhältnis von 15,195 %

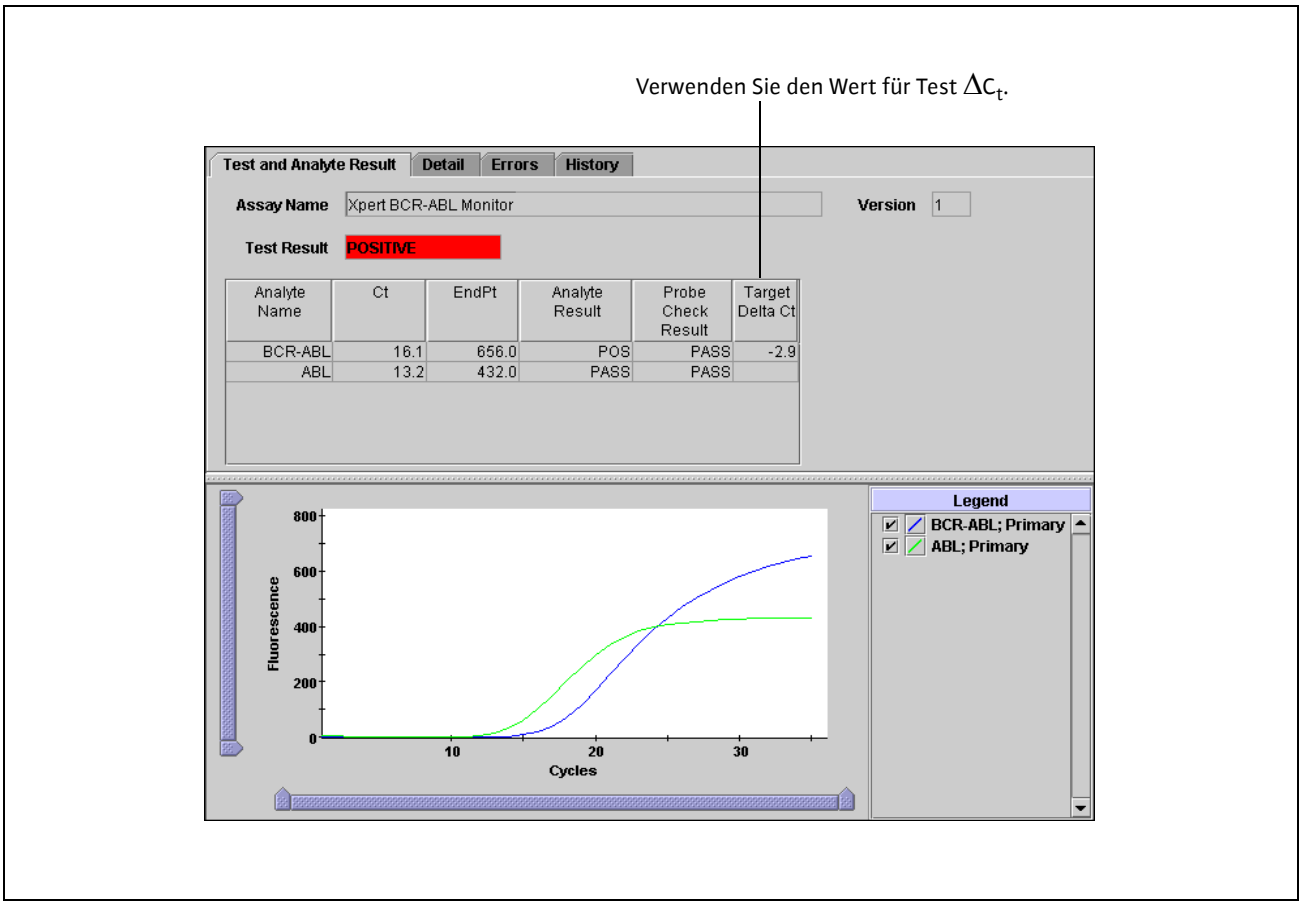

Abbildung 2. Das Fenster GeneXpert Dx System – View Results (GeneXpert Dx-System – Ergebnisse anzeigen), positives Ergebnis

- **BCR-ABL-negative Tests** – Sollte BCR-ABL nicht detektierbar sein und die ABL-Werte größer als 12, aber kleiner als 18, muß zuerst das theoretische BCR-ABL-Verhältnis berechnet werden, bevor ein Ergebnis berichtet wird. Dafür ist vom ABL CT - Wert 32 abzuziehen (Test ABL CT-32). Der ABL C_t-Wert wird dem Fenster View Results (Ergebnisse anzeigen) (Delta Ct) der GeneXpert Dx Systemsoftware entnommen (figure 3). Berechnen Sie das theoretische Prozentverhältnis BCR-ABL. Melden Sie ein Ergebnis, das unter dem theoretischen Prozentverhältnis liegt, d. h. dem Wert, der ermittelt worden wäre, wenn ein richtiger BCR-ABL C_t-Wert von 32 gemessen worden wäre.

  Beispiel

  Chargenspezifischer $E_{\Delta Ct} = 1{,}915$
  Test ABL $C_t = 15{,}4$
  Theoretischer $\Delta C_t = (15{,}4 - 32) = -16{,}6$
  Theoretisches Prozentverhältnis BCR-ABL/ABL = $1{,}915^{(-16{,}6)} \times 100 = 0{,}0021\ \%$

  Ergebnis: BCR-ABL ist bei einer Nachweisgrenze von 0,0021 % nicht nachweisbar.

Wenn BCR-ABL nicht nachgewiesen wird, verwenden Sie den ABL-Wert, falls zusätzliche Tests erforderlich sind. Beispielsweise ist dann, wenn der ABL C_t-Wert größer als 15 ist, die Nachweisgrenze möglicherweise höher als 0,001 %. Wenn niedrige BCR-ABL-Werte vermutet werden, wiederholen Sie den Test. Späte ABL C_t-Werte führen u. U. ebenfalls dazu, dass der Test wiederholt werden muss.

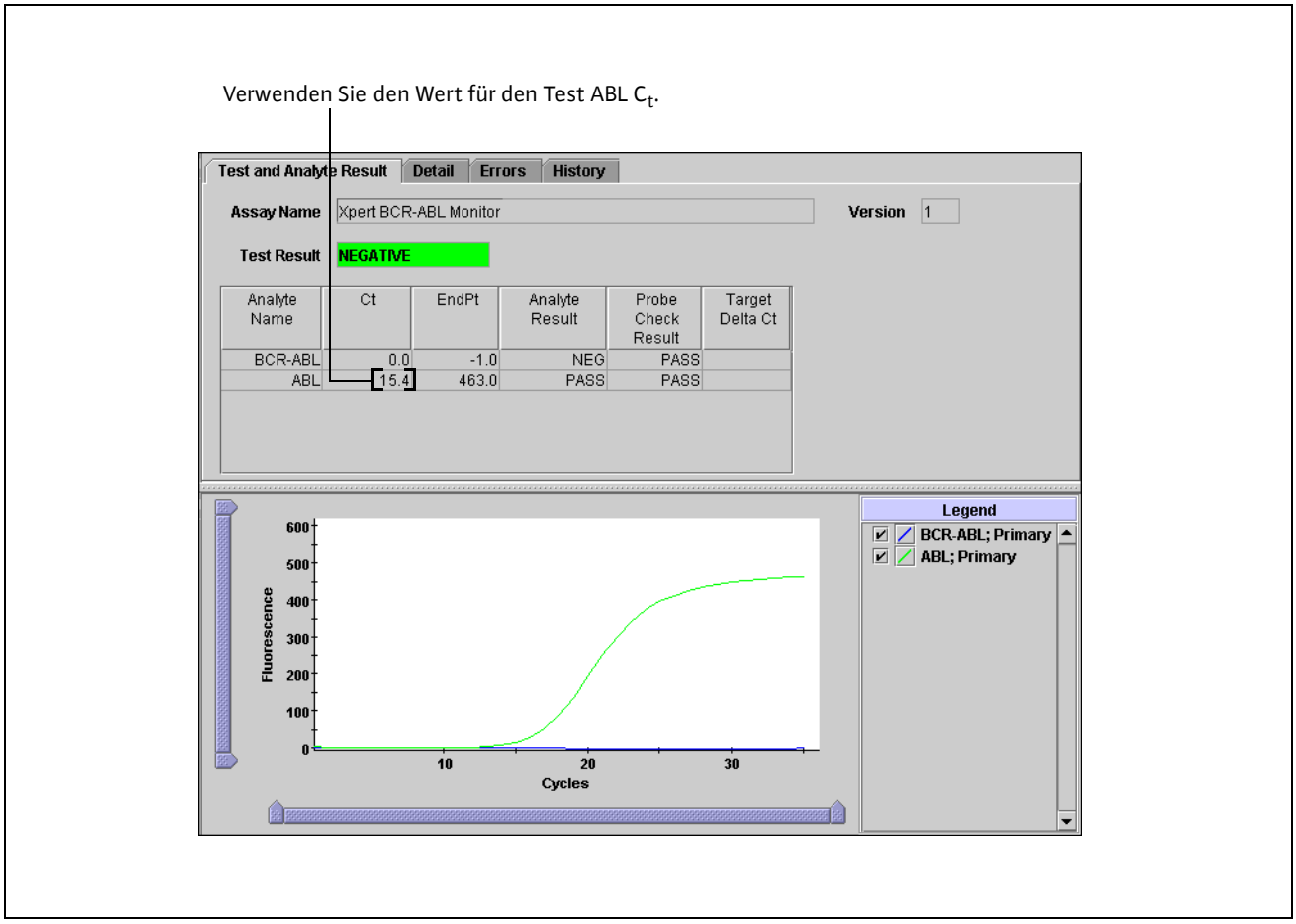

Abbildung 3. Das Fenster GeneXpert Dx System – View Results (GeneXpert Dx-System – Ergebnisse anzeigen), negatives Ergebnis

Gründe für eine Wiederholung der Untersuchung

Ein UNGÜLTIGES und/oder NF-Ergebnis zeigt an, dass eine oder beide Kontrollen (ABL oder Sondenprüfung) fehlgeschlagen sind oder ein Verarbeitungsproblem aufgetreten ist. Der Lauf ist ungültig und sollte mit einer frischen Probe wiederholt werden.

Für eine Beschreibung von Fehlermeldungen und Fehlerbehebungsinformationen siehe das *Benutzerhandbuch zum Xpert Dx-System.*

Einschränkungen

- Die Leistung des Xpert BCR-ABL-Monitors wurde nur anhand der Prozeduren geprüft, die in der Packungsbeilage beschrieben sind. Änderungen an diesen Prozeduren können die Leistung des Tests beeinträchtigen.
- Ergebnisse des Xpert BCR-ABL-Monitors sollten unter Berücksichtigung anderer Labor- und klinischer Daten interpretiert werden, die dem Kliniker zur Verfügung stehen.
- Der Xpert BCR-ABL-Monitor weist die p190- oder andere Translokationen nicht nach, die in einer peripheren Blutprobe eines Patienten mit Leukämie vorhanden sein könnten.
- Der Xpert BCR-ABL-Monitor sollte mit EDTA- oder mit Citrat antikoaguliertem Vollblut verwendet werden. Heparin eignet sich nicht als Antikoagulanz, da es die PCR-Reaktion hemmt.
- Jede Xpert BCR-ABL Monitor-Einwegkassette dient zur Durchführung eines einzigen Tests. Gebrauchte Kassetten nicht erneut verwenden.

Leistungsmerkmale

Genauigkeit

Die Genauigkeit wurde in drei Einrichtungen anhand einer einfachblinden Vergleichsstudie von vier Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen an BCR/ABL geprüft. Es wurden insgesamt 240 Proben für die Studie verwendet. Die untersuchten Proben umfassten vier Probenlevel: eine negative und jeweils eine auf niedrigem, mäßigem und hohem BCR-ABL RNA-Level. Diese Proben wurden mit Vollblut vorbereitet und von gesunden Spendern (mit Citrat antikoaguliertem Blut) entnommen. Es wurden unterschiedliche Mengen an K562 RNA hinzugefügt (Ambion-Katalog-Nr. 7832), nachdem alle Blutproben lysiert waren. Jede Einrichtung erhielt insgesamt 80 Proben, die aus 20 Proben von vier verschiedenen Leveln bestanden. Diese Proben wurden in insgesamt 20 Läufen mit jeweils vier Proben und täglich vier Läufen über fünf Tage analysiert. Es wurden vier Proben – jeweils eine Probe von jedem Level – pro Lauf verwendet. Zwei Technologen jeder Einrichtung nahmen an der Studie teil, wobei jeder täglich zwei Durchläufe mit vier Proben durchführen musste. GeneXpert legte den Level an BCR/ABL jeder Probe fest. Die Genauigkeit wurde geschätzt gemäß der CLSI-Richtlinie für Präzisionsleistungen von klinischen Chemiegeräten.[22]

Table 1. Untersuchungsgenauigkeit

Position	Probe	N	Durchschnittliche % BCR-ABL/ABL	% BCR-ABL/ABL Std. Abw.	95 % CI	% CV
1	BCR-ABL: negativ	20	< 0.000133% (negativ)	—	—	—
2	BCR-ABL: negativ	20	< 0.000175% (negativ)	—	—	—
3	BCR-ABL: negativ	20	< 0.000163% (negativ)	—	—	—
Insgesamt	BCR-ABL: negativ	60	< 0.000157% (negativ)	—	—	—
1	BCR-ABL: niedrig	20	0.00477%	0.00477%	0.00218 – 0.00737%	100.0%
2	BCR-ABL: niedrig	19	0.00285%	0.00285%	0.00125 – 0.00445%	100.0%
3	BCR-ABL: niedrig	20	0.00528%	0.00528%	0.00241 – 0.00815%	100.0%
Insgesamt	BCR-ABL: niedrig	59	0.00430%	0.00524%	0.00273 – 0.00587%	121.8%
1	BCR-ABL: mäßig	20	1.003%	0.324%	0.827 – 1.179%	32.3%
2	BCR-ABL: mäßig	20	0.856%	0.427%	0.624 – 1.088%	49.8%
3	BCR-ABL: mäßig	19	1.005%	0.433%	0.762 – 1.248%	43.1%
Insgesamt	BCR-ABL: mäßig	59	0.954%	0.397%	0.835 – 1.073%	41.6%
1	BCR-ABL: hoch	20	12.18%	2.40%	10.88 – 13.49%	19.7%
2	BCR-ABL: hoch	20	12.34%	7.31%	8.36 – 16.32%	59.2%
3	BCR-ABL: hoch	20	12.18%	4.10%	9.95 – 14.41%	33.7%
Insgesamt	BCR-ABL: hoch	60	12.24%	5.03%	10.74–13.73%	41.1%

Klinische Leistung:

Die Leistung der Untersuchung wurde in drei Einrichtungen anhand von 46 Proben getestet, die von 2 Patienten mit CML stammten. Beide Einrichtungen führten ihre im eigenen Labor entwickelten Untersuchungen zum Vergleich durch. Die Daten wurden in drei Kategorien unterteilt:

- Negativ (<0,01 % BCR-ABL nachgewiesen)
- Schwach positiv (0,01 % bis 0,05 % BCR-ABL nachgewiesen)
- Stark positiv (>0,05 % BCR-ABL nachgewiesen)

Table 2. Untersuchungsleistung

Testergebnisse	Anzahl der CML–Proben
Negativ bei beiden Methoden	17
Negativ laut der im Labor entwickelten Methode, jedoch schwach positiv mit GeneXpert	3
Schwach positiv nach beiden Methoden	8
Stark positiv nach beiden Methoden	18

Vereinbarung bei negativen Ergebnissen: 17/20 = 85 %
Vereinbarung bei positiven Ergebnissen: 26/26 = 100 %

Spezifität

Die Spezifität der Untersuchung wurde anhand von 44 normalen Citrat- und EDTA-Blutproben aus vier Einrichtungen getestet. Alle normalen Proben waren negativ auf BCR-ABL und ergaben eine Spezifität von 100 %.

Die Spezifität der Untersuchung wurde darüber hinaus in drei Einrichtungen anhand von 12 Blutproben von Patienten mit anderen hämatologisch Erkrankungen wie akuter myeloischer Leukämie, akuter lymphozytischer Leukämie, Hodgkin-Lymphom, multiplem Myelom und follikulärem Lymphom getestet. Alle Proben waren negativ auf BCR-ABL und ergaben eine Spezifität von 100 %.

Nachweis- und Linearitätsgrenzen

Abbildung 4 zeigt die Nachweis- und Linearitätsgrenzen von Testergebnissen, die bei einem einzigen Lauf von 44 Kartuschen erzeugt wurden. Die in dieser Packungsbeilage beschriebene Prozedur wurde eingehalten, mit Ausnahme folgender Serie: Eine Verdünnungsserie aus leukämischer (K562) Gesamt-RNA von (Ambion Katalog-Nr. 7832) wurde mit Alkohol versetzt, in einem mit Citratblut nachdem Ethanol in den Probenbehälter gegeben worden war. Für jede RNA-Konzentration wurden vier Replikate erzeugt, jedoch mit folgenden Ausnahmen: sechs Replikate wurden für 30 pg- und 10 pg-Proben durchgeführt.

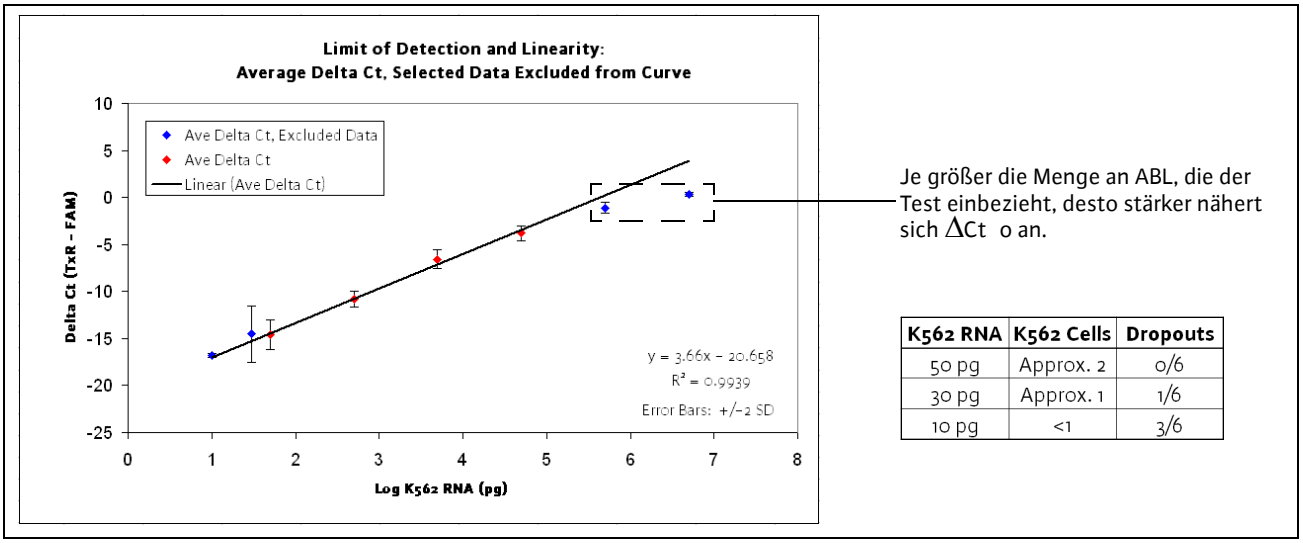
Limit of Detection and Linearity:
Average Delta Ct, Selected Data Excluded from Curve
Ave Delta Ct, Excluded Data
Ave Delta Ct
Linear (Ave Delta Ct)
Delta Ct (TxR - FAM)
Log K562 RNA (pg)
y = 3.66x - 20.658
R² = 0.9939
Error Bars: +/-2 SD
Je größer die Menge an ABL, die der Test einbezieht, desto stärker nähert sich ΔCt o an.
K562 RNA | K562 Cells | Dropouts
50 pg | Approx. 2 | 0/6
30 pg | Approx. 1 | 1/6
10 pg | <1 | 3/6

Abbildung 4. Nachweis- und Linearitätsdatengrenze.

Quellenangaben

[1] Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer Statistics 2005. CA Cancer J Clin. 2005;55:10-30.

[2] Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. Nature. 1973;243:290-293.

[3] NCCN. Clinical Practice Guidelines in Oncology; Chronic Myelogenous Leukemia. Version 1. 2006.

[4] Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. Blood. 2005;105(7):2640-2653.

[5] Kantarjian HM, Talpaz M, Cortes J, et al. Quantitative polymerase chain reaction monitoring of BCR-ABL during therapy with imatinib mesylate (STI571;Gleevec) in chronic-phase chronic myelogenous leukemia. Clin Cancer Res. 2003;9(1):160-6.

[6] Gabert J et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia-A Europe Against Cancer Program. Leukemia 2003;1-40.

[7] Sawyers C. Chronic Myeloid Leukemia. NEJM. 1999;340(17):1330-40.

[8] Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood. 2000;96(10):3343-56.

[9] Goldman JM, Kaeda JS, Cross NC. Clinical decision making in chronic myeloid leukemia based on polymerase chain reaction analysis of minimal residual disease. Blood. 1999;94(4):1484-6.

[10] Radich JP. The detection and significance of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia. Medicina (B Aires) 2000;60 Suppl 2:66-70.

[11] Hochhaus A, Reiter A, Skladny H, et al. Molecular monitoring of residual disease in chronic myelogenous leukemia patients after therapy. Recent Results Cancer Res 1998;144:36-45.

[12] Hochhaus A, Reiter A, Saussele S, et al. Molecular heterogeneity in complete cytogenetic responders after interferon-alpha therapy for chronic myelogenous leukemia: low levels of minimal residual disease are associated with continuing remission. German CML Study Group and the UK MRC CML Study Group. Blood. 2000;95(1):62-6.

[13] Radich JP, Gehly G, Gooley T, et al. Polymerase chain reaction detection of the BCR-ABL fusion transcript after allogeneic marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: results and implications in 346 patients. Blood 1995;85(9):2632-8.

[14] Olavarria E, Kanfer E, Szydlo R, et al. Early detection of BCR-ABL transcripts by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction predicts outcome after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. Blood. 2001;97(6):1560-5.

[15] Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer Program. Leukemia. 2003;17:2318-2357.

[16] Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) - a Europe Against Cancer Program. Leukemia. 2003;17:2474-2486.

[17] van der Velden VH, Boeckx N, Gonzalez M, et al. Differential stability of control gene and fusion gene transcripts over time may hamper accurate quantification of minimal residual disease a study within the Europe Against Cancer Program. Leukemia. 2004;18:884-886.

[18] van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. Leukemia. 2003;17:1013-1034.

[19] World Health Organization. Guidelines on Standard Operating Procedures for HAEMATOLOGY, from http://w3.whosea.org/EN/Section10/Section17/Section53.htm.

[20] U.S. Centers for Disease Control. Morbidity and Mortality Weekly Review. 1987;36(suppl. 2S):2S-18S.

[21] NIOSH Publication No. 2005-151: NIOSH Pocket Guide to Chemical Hazards, September 2005.

[22] CLSI. Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline. CLSI document EP5-A (ISBN 1-56238-368-X). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898, USA, 1999.

Patent–Nachricht zum Käufer

Der Erwerb des vorliegenden Produkts ermöglicht dem Käufer die Erstellung von Diagnosedienstleistungen zur In-Vitro-Diagnostik beim Menschen. Es wird mit Ausnahme des besonderen Verwendungsrechts aus dem Kauf hierdurch weder ein allgemeines Patent noch eine Lizenz anderer Art gewährt.

Unterstützung

Wenn Sie Unterstützung benötigen, wenden Sie sich mithilfe folgender Kontaktdaten an Cepheid. Geben Sie bei Ihrem Anruf bzw. in Ihrer E-Mail auf jeden Fall die Seriennummer des Instruments und die Lot-ID des Reagenz an.

Nordamerika

Kontaktdaten für technischen Support:

Tel: +1.888.838.3222
E-Mail: techsupport@cepheid.com

Sie können den technischen Support von Cepheid Montags bis Freitags von 6:00 bis to 17:00 Uhr Pazifischer Zeit erreichen.

EU

Kontaktdaten für technischen Support:

Tel: +33.563.82.53.19
E-Mail: techsupport@cepheideurope.fr

Andere Standorte

Wenn Sie sich an Ihre lokale Cepheid-Niederlassung.

Symboltabelle

Symbol	Bedeutung
	Katalog–Nr.
	Medizinisches Gerät zur *In Vitro*–Diagnostik
	Nicht wiederverwenden
	Hersteller
	Reicht für <n>–Tests
	Kontrolle
	Autorisierte Vertretung in der Europäischen Gemeinschaft
	Temperaturbegrenzung
	Biologische Gefahr

Hersteller

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089-1189

Telefon: +1.408.541.4191
Fax: +1.408.541.4192

EC REP Autorisierte Vertretung

Cepheid Europe
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
Frankreich

Tel: +33.563.82.53.00
Fax: +33.563.82.53.01
E-Mail: cepheid@cepheideurope.fr

CE IVD

Februar 2006

Español

Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*

Denominación común

Xpert BCR-ABL Monitor™

Nombre común o de uso frecuente

Xpert BCR-ABL Monitor

Uso previsto

Xpert BCR-ABL Monitor, que detecta la translocación cromosómica de BCR-ABL, es un ensayo de RCP de transcripción inversa en tiempo real (TI-RCP) utilizado como complemento en el proceso de control de la transcripción de p210 (b2a2 y b3a2) en los linfocitos de la sangre periférica (PBL) de paciente con leucemia mielógena crónica (LMC). Para confirmar un aumento considerable de la transcripción de p210, es necesario utilizar otro método como, por ejemplo, el análisis citogenético de metafase estándar de una muestra de médula ósea del paciente.

Resumen y explicación

La leucemia mielógena crónica (LMC) forma parte de un grupo de enfermedades denominado trastornos mieloproliferativos, con un total de 4600 casos nuevos diagnosticados y 850 fallecimientos en el año 2005.[1] En más del 95% de los pacientes con LMC se observa un cromosoma Filadelfia (Ph1) resultante de una translocación recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22. Esta translocación implica la transferencia del gen Abelson (ABL) del cromosoma 9 a la región del grupo de puntos de ruptura (BCR) del cromosoma 22, lo que tiene como resultado un gen BCR-ABL fusionado.[2, 4] El gen de fusión genera una proteína, p210 (b2a2 y b3a2), que es una tirosinasa con una actividad desregulada con un papel clave en el desarrollo de la LMC.[3]

En las directrices actuales del programa europeo contra el cáncer y la National Comprehensive Cancer Network (NCCN) para el tratamiento de pacientes con LMC se recomienda el uso de los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (TI-RCP) durante el tratamiento inicial de los pacientes con LMC en fase grave, para el control de la enfermedad residual mínima y la identificación de pacientes que presenten un alto riesgo de recaída.[3, 15] Se ha demostrado que TI-RCP es un método preciso y de gran sensibilidad para la detección del gen de fusión BCR-ABL[3-14] y más sensible que la hibridación in situ fluorescente (FISH) o la citogenética.[3] Una ventaja adicional de la RCP cuantitativa frente al método FISH y la citogenética es la alta correlación de los resultados de RCP obtenidos de la médula ósea con las muestras de sangre periférica.[3, 15] Por consiguiente, la RCP puede reducir los aspirados medulares necesarios en la actualidad en el caso de los pacientes con LMC. Aunque la RCP cuantitativa se va a convertir en el punto de referencia para el control de la enfermedad residual, el uso de este método aún no es generalizado debido a la variación de las técnicas y los controles y a la ausencia de ensayos comercializados.[3]

Principio del procedimiento

El sistema GeneXpert Dx automatiza e integra la purificación de muestras, la multiplicación del ácido nucleico y la detección de la secuencia objetivo en muestras sencillas o complejas mediante una reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (TI-RCP) en tiempo real. El sistema consta de un instrumento, un ordenador personal y un software cargado previamente para la realización de pruebas con las muestras recogidas y la visualización de los resultados. Este sistema requiere el uso de cartuchos GeneXpert desechables de un solo uso y recipientes para los reactivos y el proceso de RCP. Dado que los cartuchos son independientes, se elimina el riesgo de contaminación cruzada. Si desea obtener una descripción detallada del sistema, consulte el *Manual del operador del sistema GeneXpert*.

Además del sistema GeneXpert Dx, se ha diseñado Xpert BCR-ABL Monitor para detectar la transcripción de translocación de BCR-ABL y la secuencia de control endógeno de ABL en las muestras de sangre periférica.[15-18] En concreto, los iniciadores y la sonda de BCR-ABL se han diseñado para la detección de la translocación del punto de ruptura principal de BCR-ABL p210 (b2a2 y b3a2) y los iniciadores y la sonda de ABL se han diseñado para la detección de la secuencia de ABL. Ninguno de los iniciadores o sondas de ABL se superponen en el sitio de la mutación de cinasa ABL según los estudios realizados hasta la fecha.

Para realizar una prueba, la mezcla de la muestra y los tres reactivos se transfiere a los compartimentos especificados del cartucho Xpert BCR-ABL Monitor, el cartucho se carga en el instrumento y la prueba se introduce en el software del sistema. Durante el proceso de prueba, el sistema GeneXpert Dx (1) introduce la muestra y los reactivos en los distintos compartimentos del cartucho, (2) aísla el ARN total de la sangre completa mediante la unión del ARN al material en fase sólida, (3) lava y elimina los inhibidores, (4) diluye el ARN, (5) hidrata las perlas de reactivos y combina la mezcla con el ARN diluido, (6) introduce la mezcla de la muestra y los reactivos en el tubo de reacción, (7) realiza comprobaciones de calidad para confirmar que la preparación de la muestra es correcta y (8) realiza el ensayo TI-RCP seguido de una RCP en tiempo real integrada. El proceso de prueba para BCR-ABL dura aproximadamente 2 horas y 20 minutos.

Reactivos e instrumentos

Material suministrado

El kit Xpert BCR-ABL Monitor (BCR-100N-10) contiene reactivos suficientes para procesar 10 muestras de paciente o de control de calidad. El kit incluye 10 paquetes de ensayo individuales. Cada paquete de ensayo contiene lo siguiente:

- Cartucho Xpert BCR-ABL Monitor
  - Iniciadores (directo e inverso)
  - Sondas
  - dNTP
  - Transcriptasa inversa
  - Polimerasa Taq
  - Tris-HCl, pH 8,6
  - HEPES, pH 7,2
  - KCl
  - $MgCl_2$
  - BSA (albúmina sérica bovina)
- Reactivos para la preparación de muestras de sangre
  - Contenedor de muestras (S)
  - Proteinasa K (PK) (50 µl)
    - $CaCl_2$
    - Glicerol
    - Proteinasa K
    - Tris-HCl, pH 7,5
  - Reactivo de lisis (LY) (1,8 ml)
    - $CaCl_2$
    - Clorhidrato de guanidina
    - EDTA
    - SDS
    - Tris-HCl, pH 6,4
    - Tween-20
    - Urea
  - Reactivo de lavado (1) (3,3 ml)
    - Etanol
    - Tiocianato de guanidina
    - Tris-HCl, pH 7,0
  - Reactivo de aclarado (2) (1,8 ml)
    - Clorhidrato de cisteamina
    - EDTA
    - KCl
    - Monotioglicerol (MTG)
    - PEG
    - Azida sódica
    - Tris, pH 7,0
    - Tween-20
    - Agua
  - Reactivo de dilución (3) (1,8 ml)
    - Agua tratada con DEPC
    - Azida sódica

Nota:

- Puede solicitar las hojas de datos de seguridad de los materiales (MSDS) para todos los reactivos suministrados con este ensayo al servicio técnico de Cepheid.
- La albúmina sérica bovina (BSA) de este producto ha sido producida exclusivamente a partir de plasma bovino procedente de Estados Unidos. La fabricación de BSA también ha sido realizada en Estados Unidos. Los animales no fueron alimentados con proteínas de rumiantes ni con ninguna otra proteína animal, y fueron sometidos a pruebas ante- y post-mortem. Durante el procesamiento, el material no se mezcló en forma alguna con ningún otro material procedente de animales.

Almacenamiento y manipulación

- Almacene el contenido del kit Xpert BCR-ABL Monitor a 2 – 8 °C.
- No utilice reactivos o cartuchos después de la fecha de caducidad indicada.
- No abra los reactivos hasta que estén listos para su uso.
- Utilice el paquete de ensayo Xpert BCR-ABL Monitor en un plazo de 30 minutos tras su apertura.
- Salvo en el caso del reactivo de lisis, no utilice los reactivos si observa que están turbios o se han decolorado.
- Si el reactivo de lisis está turbio, debe calentarlo a 56 °C durante 5 minutos antes de usarlo.

Material necesario no suministrado

- Sistema GeneXpert Dx
- Agitador
- Microcentrifugadora (1000 g como mínimo)
- Pipetas y puntas de pipeta con filtro de aerosol (tamaños recomendados: 200 µl y 1000 µl)
- Etanol al 100%
- (Opcional) Pipetas de transferencia

Nota: El número de referencia del sistema GeneXpert Dx varía según la configuración. Póngase en contacto con Cepheid para consultar la configuración que desee y el número de referencia correspondiente.

Advertencias y precauciones

- Todas las muestras biológicas se deben tratar como posibles agentes de transmisión de infecciones. Dado que es imposible determinar los posibles focos de infección, todas las muestras de origen humano se deben tratar teniendo en cuenta las precauciones universales. Las directrices para la manipulación de muestras se pueden consultar en la Organización Mundial de la Salud[19] o en los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de EE.UU.[20]
- Todos los materiales peligrosos se deben desechar de acuerdo con las normas de seguridad del laboratorio.
- No sustituya los reactivos Xpert GBS por ningún otro reactivo.
- Durante un período de tiempo, la azida sódica puede reaccionar con el cobre, el plomo, el bronce o las soldaduras de las cañerías y generar una acumulación de compuestos altamente explosivos de azidas de plomo y cobre.[21]
- El reactivo de lavado contiene tiocianato de guanidina, que puede formar compuestos altamente reactivos si se combina con lejía. Si el líquido que contiene este reactivo se derrama, debe limpiar el área con detergente de laboratorio y agua.
- En caso de no seguir los procedimientos y directrices descritos en este documento o de utilizar reactivos distintos a los suministrados con este kit, se pueden generar resultados incorrectos o efectos adversos. Por ejemplo, no añada más cantidad de la necesaria en el caso de la muestra y los reactivos.
- Una cifra de leucocitos excesivamente alta puede aumentar la presión del cartucho y anular los experimentos.
- Si el cartucho Xpert BCR-ABL Monitor se cae o se agita después de añadir la muestra y los reactivos, el contenido se puede derramar en los compartimentos incorrectos y esto puede generar resultados no válidos. El uso de tubos deformados o rotos también puede generar resultados incorrectos. No agite ni deje caer el cartucho. Si el tubo de reacción está deformado o roto, no utilice el cartucho.

Recogida y transporte de muestras

Recoja las muestras de sangre periférica de acuerdo con las técnicas estándar para TI-RCP de cada centro. Recoja las muestras de sangre en tubos que contengan EDTA o citrato sódico como anticoagulante. Conserve las muestras de sangre a 2 – 8 °C y haga una prueba 48 horas después de la recogida. No utilice heparina como anticoagulante, ya que puede inhibir la RCP.

Procedimiento

Precauciones

- Siga los procedimientos de seguridad del laboratorio para trabajar con productos químicos y manipular las muestras.
- Utilice un conjunto de pipetas y reactivos sólo para la preparación de las muestras. Separe los cartuchos usados de los cartuchos y reactivos sin usar.
- No abra la tapa del cartucho Xpert BCR-ABL Monitor salvo para añadir la muestra y los reactivos.
- No agite el cartucho.
- No cargue un cartucho Xpert BCR-ABL Monitor que se haya caído o movido después de introducir la muestra y los reactivos. No cargue un cartucho con un tubo de reacción dañado.
- No abra los cartuchos Xpert BCR-ABL Monitor usados.
- Deseche los cartuchos Xpert BCR-ABL Monitor usados según la normativa de seguridad del laboratorio.

Antes de comenzar

Antes de iniciar el procedimiento, centrifugue brevemente los siguientes reactivos a 1000 g durante 10 segundos:

- Proteinasa K (PK)
- Reactivo de lisis (LY)
- Reactivo de aclarado (2)
- Reactivo de dilución (3)

Preparación del cartucho

1. Extraiga los reactivos de preparación de muestras de la bandeja sellada.
2. Añada 40 µl de proteinasa K (PK) al vial de 5 ml vacío etiquetado como Contenedor de muestras (S).
3. Añada 200 µl de la muestra de sangre al contenedor de muestras (S) que contiene proteinasa K.
4. Agite durante 5 segundos.
5. Incube a temperatura ambiente durante 1 minuto.
6. Añada 1 ml del reactivo de lisis (LY) al contenedor de muestras (S).
7. Agite durante 10 segundos.
8. Incube a temperatura ambiente durante 10 minutos.
9. Añada 1 ml de etanol al 100% al contenedor de muestras (S).
10. Agite durante 10 segundos. Reserve la preparación.
11. Retire un cartucho de la bandeja sellada.

12. Abra la tapa del cartucho y transfiera el contenido de los tubos de reactivos y el contenedor de muestras a los compartimentos del cartucho del modo siguiente (figure 1):
    - **S**: Pipetee todo el contenido del contenedor de muestras (S).
    - **1**: Pipetee 2,1 ml como mínimo del contenido del tubo de reactivo de lavado (1).
    - **2**: Pipetee 1 ml como mínimo del contenido del tubo de reactivo de aclarado (2).
    - **3**: Pipetee 1 ml como mínimo del contenido del tubo de reactivo de dilución (3).
13. Cierre la tapa del cartucho. Asegúrese de que la tapa está bien cerrada.

Importante: Asegúrese de cargar el cartucho en el instrumento GeneXpert Dx e inicie la prueba 15 minutos después de preparar el cartucho.

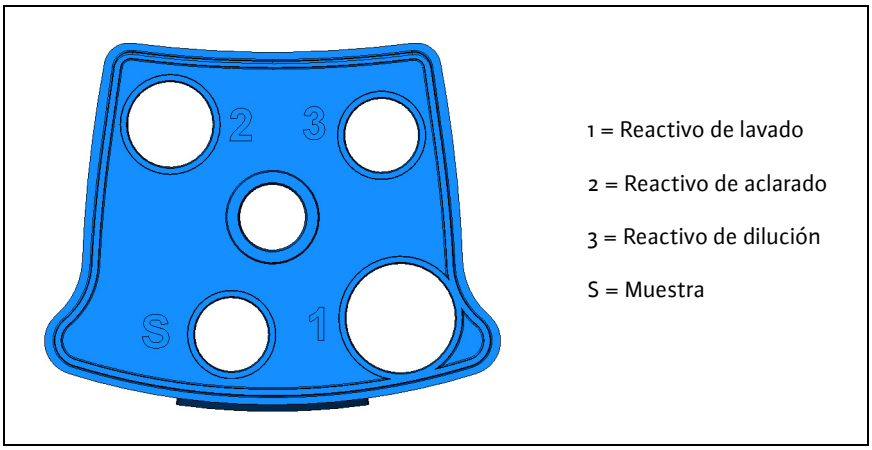

Figura 1. Compartimentos del cartucho Xpert BCR–ABL Monitor.

Realización de la prueba

En esta sección se incluyen los pasos básicos para realizar la prueba. Si desea obtener instrucciones detalladas, consulte el *Manual del operador del sistema GeneXpert Dx.*

1. Encienda el equipo y el instrumento GeneXpert Dx.
2. En el escritorio de Windows®, haga doble clic en el icono de acceso directo a GeneXpert Dx.
3. Inicie una sesión en el software del sistema GeneXpert Dx con su nombre de usuario y contraseña.
4. En la ventana del sistema GeneXpert Dx, haga clic en **Define Assays (Definir ensayos)** y asegúrese de que la definición de ensayo de Xpert BCR-ABL Monitor se ha importado al software. (Consulte las instrucciones suministradas con el CD de ensayos.) Si no tiene el CD de Xpert BCR-ABL Monitor, póngase en contacto con el servicio técnico de Cepheid.
5. En la ventana del sistema GeneXpert Dx, haga clic en **Create Test (Crear prueba).** Aparece la ventana Create Test (Crear prueba).
6. Escanee el código de barras del cartucho Xpert BCR-ABL Monitor. El software rellena automáticamente los siguientes campos: **Select Assay (Seleccionar ensayo), Reagent Lot ID (Id. de lote de reactivos) y Expiration Date (Fecha de caducidad).**
7. Seleccione el módulo del instrumento.
8. En el cuadro **Sample ID (Id. de muestra)**, escanee o escriba el Id. de muestra. Asegúrese de escribir el Id. de muestra correcto. El Id. de muestra está asociado a los resultados de la prueba y se muestra en la ventana **View Results (Ver resultados)** y en todos los informes.
9. Haga clic en **Start Test (Iniciar prueba).** En el cuadro de diálogo que aparece, escriba la contraseña.
10. Abra la puerta del módulo del instrumento mientras la luz esté parpadeando en verde y cargue el cartucho. Cierre la puerta. Una vez finalizada la prueba, la luz del módulo del instrumento se apaga.
11. Abra la puerta del módulo del instrumento y retire el cartucho. Siga las normas de seguridad del laboratorio para desechar el cartucho.

Visualización e impresión de los resultados

Si desea obtener instrucciones detalladas sobre cómo ver e imprimir los resultados, consulte el *Manual del operador del sistema GeneXpert Dx*.

CONTROL Control de calidad

Cada prueba contiene un control endógeno (ABL) y un control de comprobación de sonda. No se necesita ningún control externo. No obstante, si desea realizar un control de calidad adicional, puede analizar dos controles externos una vez al mes.

- **Control endógeno**: normaliza los objetivos y garantiza el uso de una cantidad de muestra suficiente en la prueba. Debido a su escasa variabilidad, el control endógeno también se puede utilizar para indicar la contaminación del inhibidor y la muestra. El control endógeno se toma de la muestra.
- **Comprobación de sonda**: se confirma la presencia e integridad de las sondas etiquetadas. El estado de comprobación de sonda de aprobado indica que los resultados de dicha comprobación cumplen los criterios de aceptación.

Interpretación de los resultados

U_c de ABL válido

- El U_c de ABL debe ser mayor que o igual a 12 y menor que o igual a 18 con un valor de punto final mayor que o igual a 200.
- Si el valor de U_c es menor que 12, el punto final es menor que 200 o la curva de RCP es incorrecta, repita la prueba con 20 µl de la muestra original.
- Si el valor de U_c de ABL es mayor que 18, repita la prueba con una muestra nueva.

U_c de BCR–ABL positivo válido

- El U_c de BCR-ABL debe ser mayor que o igual a 12 y menor que o igual a 32 con un valor de punto final mayor que o igual a 40.
- Si el valor de U_c de BCR-ABL es menor que 12, repita la prueba con 20 µl de la muestra original.
- Si el valor de U_c de BCR-ABL es mayor que 32, las transcripciones de BCR-ABL no se detectan.

Resultados cualitativos

- Cualquier valor de U_c de BCR-ABL menor que 32 y con un valor de U_c de ABL válido tiene como resultado una detección positiva de las transcripciones de BCR-ABL.
- La ausencia del valor de U_c de BCR-ABL o un valor de BCR-ABL mayor que 32, junto con un resultado de ABL válido, tiene como reusltado una detección fallida de BCR-ABL.

Resultados cuantitativos

Se suministra un certificado de análisis con cada kit de Xpert BCR-ABL con una curva estándar específica del lote para Xpert BCR-ABL Monitor y un valor de rendimiento ($E_{\Delta Uc}$). La curva estándar indica ΔU_c ($U_{t(ABL)}$ - $U_{t(BCR-ABL)}$) como una función de la concentración de ARN K562 concentration en un fondo de ARN de sangre completa normal. El valor de rendimiento ($E_{\Delta Uc}$) se calcula a partir de la pendiente de la curva estándar del modo siguiente: $E_{\Delta Uc} = 10^{(1/\text{pendiente})}$.

- **Pruebas positivas de CR-ABL**: para obtener un resultado de prueba positivo, la proporción porcentual de BCR-ABL/ABL se calcula mediante la siguiente ecuación.
  El valor de $E_{\Delta Uc}$ se obtiene del certificado de análisis específico del lote que se suministra con el kit de ensayo. El valor de ΔU_c de prueba se obtiene de la ventana View Results (Ver resultados) (columna Target Delta Ct (Uc delta objetivo)) del software del sistema GeneXpert Dx (figure 2).

  Proporción porcentual de BCR-ABL/ABL = $E_{\Delta Ut}^{(\Delta Uc)} \times 100$

  Ejemplo

  $E_{\Delta Uc}$ específico de lote = 1,915
  ΔU_c de prueba= - 2,9
  Proporción porcentual de BCR-ABL/ABL = $1{,}915^{(-2{,}9)} \times 100 = 15{,}195\%$

  Resultado: positivo para BCR-ABL, detectado en una proporción del 15,195%

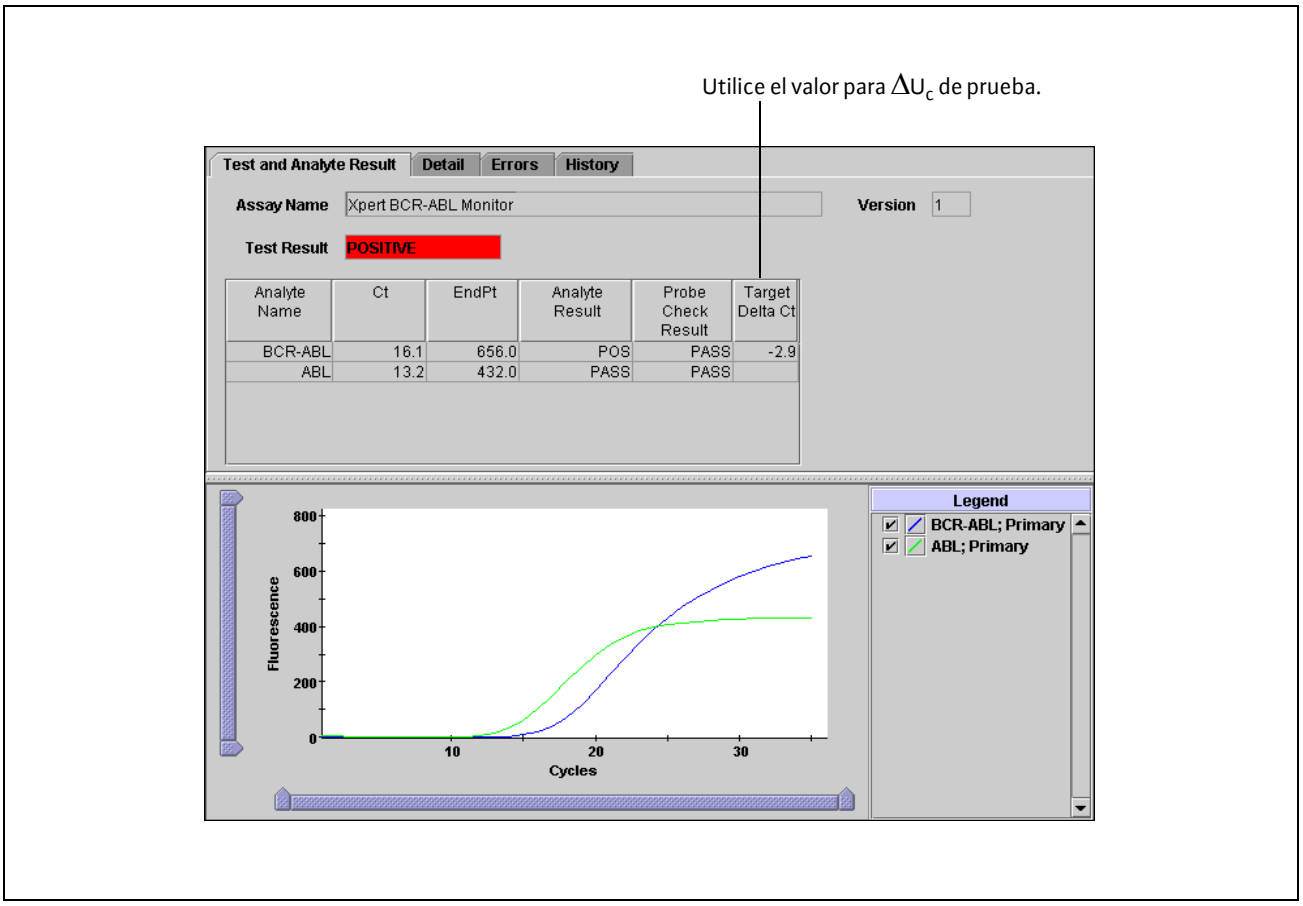

Figura 2. Sistema GeneXpert Dx: ventana View Results (Ver resultados), resultado positivo.

- **Pruebas negativas de BCR-ABL**: para los valores de ABL mayores que 12 y menores que 18, si el valor de BCR-ABL no es detectable, debe calcular primero una proporción de BCR-ABL teórica antes de comunicar los resultados. Para ello, reste 32 del valor de U_c de ABL de prueba (Ut de ABL de prueba: 32). El valor de U_c de ABL se obtiene de la ventana View Results (Ver resultados) (columna Ct (Uc)) del software del sistema GeneXpert Dx (figure 3). Calcule la proporción porcentual teórica de BCR-ABL. Indique un resultado menor que la proporción porcentual teórica, el valor que se observaría si se hubiera medido un valor de U_c de BCR-ABL de 32.

  Ejemplo

  $E_{\Delta Uc}$ específico de lote = 1,915
  U_c de ABL de prueba= 15,4
  ΔU_c teórico = (15,4-32) = -16,6
  Proporción porcentual de BCR-ABL/ABL teórica = $1{,}915^{(-16.6)} \times 100 = 0{,}0021\%$

  Resultado: BCR-ABL no detectable con un límite de detección de 0,0021%

Si no se detecta ningún valor de BCR-ABL, utilice el valor de ABL para determinar si es necesario realizar pruebas adicionales. Por ejemplo, si el valor de U_c de ABL es mayor que 15, el límite de detección puede ser mayor que 0,001%. Si se sospecha que los niveles de BCR-ABL son inferiores, repita la prueba. Los valores de U_c de ABL tardíos pueden requerir la repetición de la prueba.

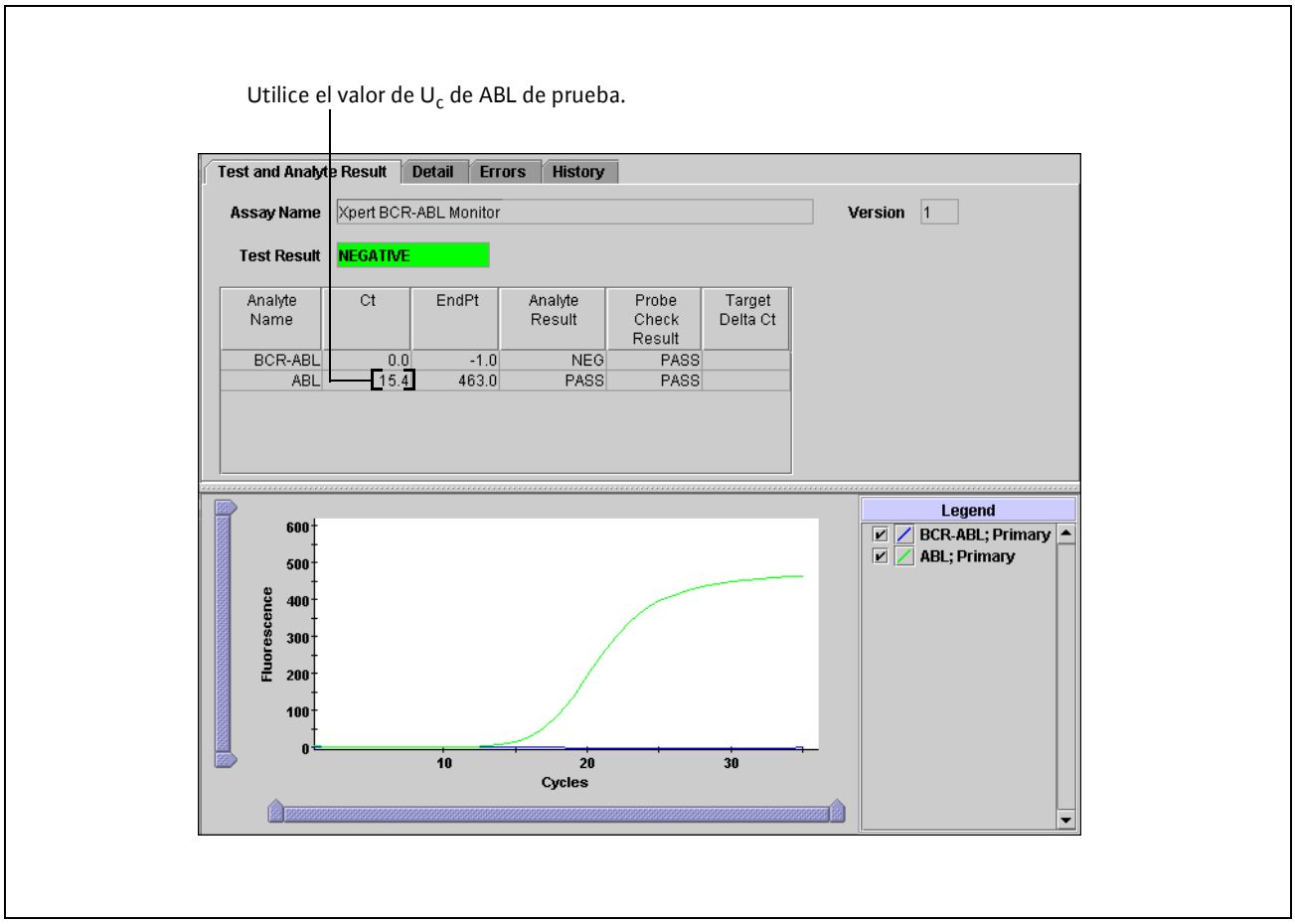

Figura 3. Sistema GeneXpert Dx: ventana View Results (Ver resultados), resultado negativo.

Motivos para repetir el ensayo

Un resultado no válido o no disponible indica que uno o ambos controles (ABL o comprobación de sonda) ha n fallado o que se ha producido un error de procesamiento. El experimento no es válido y se debe repetir con una muestra nueva.

Si desea obtener una descripción detallada de los mensajes de error e información sobre la solución de problemas, consulte el *Manual del operador del sistema GeneXpert*.

Limitaciones

- El rendimiento de Xpert BCR-ABL Monitor se ha validado mediante los procedimientos suministrados con estas instrucciones. Las modificaciones de estos procedimientos pueden alterar el rendimiento de la prueba.
- Los resultados de Xpert BCR-ABL Monitor se deben interpretar junto con otros datos clínicos y de laboratorio a disposición del médico.
- Xpert BCR-ABL Monitor no detecta p190 ni ninguna otra translocación que pueda haber en una muestra de sangre periférica de un paciente con leucemia.
- Xpert BCR-ABL Monitor se debe utilizar con sangre completa con EDTA o citrato como anticoagulante. La heparina no es apta como anticoagulante en este caso porque inhibe la RCP.
- Cada cartucho Xpert BCR-ABL Monitor de un solo uso se utiliza para procesar una prueba. No reutilice los cartuchos.

Características de rendimiento

Precisión

La precisión se ha evaluado en un estudio comparativo enmascarado realizado en tres centros con cuatro muestras a diferentes concentraciones de BCR/ABL. En este estudio se incluyó un total de 240 muestras. Las muestras de este estudio incluyeron cuatro niveles: Niveles negativo, bajo, medio y alto de ARN BCR-ABL. Estas muestras se prepararon con sangre completa (recogida con citrato anticoagulante) de donantes sanos con distintas cantidades de ARN K562 (nº de referencia 7832 de Ambion) añadidas tras la lisis de las muestras de sangre. Cada centro recibió un total de 80 muestras (20 muestras de cada uno de los cuatro niveles). Dichas muestras se analizaron en un total de 20 experimentos de los cuatro tipos de muestras (cuatro experimentos al día durante cinco días). En cada experimento se incluyeron cuatro muestras (una de cada nivel). Dos técnicos de cada centro participante en el estudio realizaron dos experimentos con las cuatro muestras al día. GeneXpert determinó el nivel de BCR/ABL de cada muestra. La precisión se calculó de acuerdo con las directrices del CLSI para la evaluación del nivel de precisión de los dispositivos de química clínica.[22]

Table 1. Precisión del ensayo.

Centro	Muestra	N	Media porcentual de BCR-ABL/ABL	Porcentaje de BCR-ABL/ABL Desv. est.	95% CI	% CV
1	BCR-ABL negativo	20	< 0.000133% (negativo)	—	—	—
2	BCR-ABL negativo	20	< 0.000175% (negativo)	—	—	—
3	BCR-ABL negativo	20	< 0.000163% (negativo)	—	—	—
General	BCR-ABL negativo	60	< 0.000157% (negativo)	—	—	—
1	BCR-ABL bajo	20	0.00477%	0.00477%	0.00218 – 0.00737%	100.0%
2	BCR-ABL bajo	19	0.00285%	0.00285%	0.00125 – 0.00445%	100.0%
3	BCR-ABL bajo	20	0.00528%	0.00528%	0.00241 – 0.00815%	100.0%
General	BCR-ABL bajo	59	0.00430%	0.00524%	0.00273 – 0.00587%	121.8%
1	BCR-ABL medio	20	1.003%	0.324%	0.827 – 1.179%	32.3%
2	BCR-ABL medio	20	0.856%	0.427%	0.624 – 1.088%	49.8%
3	BCR-ABL medio	19	1.005%	0.433%	0.762 – 1.248%	43.1%
General	BCR-ABL medio	59	0.954%	0.397%	0.835 – 1.073%	41.6%
1	BCR-ABL alto	20	12.18%	2.40%	10.88 – 13.49%	19.7%
2	BCR-ABL alto	20	12.34%	7.31%	8.36 – 16.32%	59.2%
3	BCR-ABL alto	20	12.18%	4.10%	9.95 – 14.41%	33.7%
General	BCR-ABL alto	60	12.24%	5.03%	10.74–13.73%	41.1%

Rendimiento clínico:

El rendimiento del ensayo se analizó en tres centros con un conjunto de 46 muestras de pacientes con LMC. Ambos centros realizaron además un ensayo desarrollado en laboratorio a modo de comparación. Los datos se agruparon en tres categorías:

- Negativo (<0,01 % de BCR-ABL detectado)
- Positivo bajo (de 0,01% a 0,05% de BCR-ABL detectado)
- Positivo alto (>0,05% de BCR-ABL detectado)

Table 2. Rendimiento del ensayo

Resultados de pruebas	Número de muestras de LMC
Negativo con ambos métodos	17
Negativo con el método desarrollado en el laboratorio y positivo con GeneXpert	3
Positivo bajo con ambos métodos	8
Positivo alto con ambos métodos	18

Correspondencia de resultados negativos: 17/20 = 85%
Correspondencia de resultados positivos: 26/26 = 100%

Especificidad

La especificidad del ensayo se analizó con 44 muestras de sangre con citrato y EDTA normales procedentes de cuatro centros. Todas las muestras normales fueron negativas para BCR-ABL con un resultado de especificidad del 100%.

La especificidad del ensayo se analizó en otros tres centros con un conjunto de 12 muestras de sangre de pacientes con otros trastornos hematologic, entre los que se incluyen leucemia mielógena aguda, leucemia linfocítica aguda, linfoma de Hodgkin, mieloma múltiple y linfoma folicular. Todas estas muestras normales fueron negativas para BCR-ABL con un resultado de especificidad del 100%.

Límite de detección y linealidad

En la Figure 4 se muestran los datos de límite de detección y linealidad de un solo experimento con 44 cartuchos. Se utilizó el procedimiento descrito en estas instrucciones con las siguientes excepciones: Una serie de dilución de ARN total de leucemia (K562) de Ambion (número de referencia 7832) se añadió a la sangre normal con citrato como anticoagulante después de añadir el etanol al contenedor de muestras. Se analizaron cuatro muestras duplicadas para cada concentración de ARN con las siguientes excepciones: se analizaron seis muestras duplicadas para las muestras de 30 pg y 10 pg.

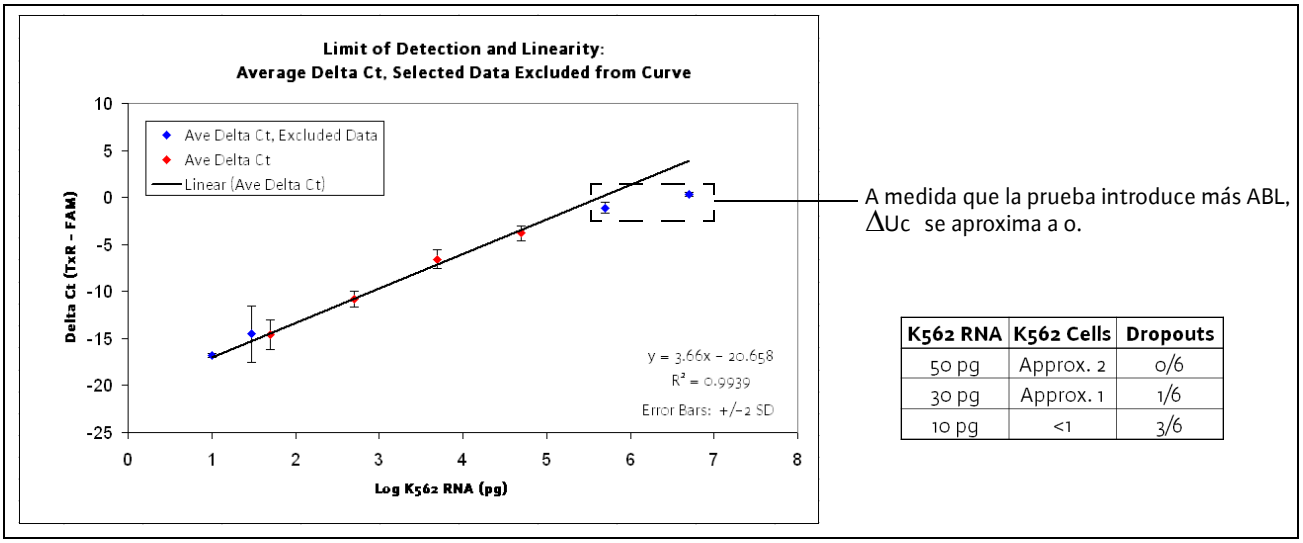
Limit of Detection and Linearity:
Average Delta Ct, Selected Data Excluded from Curve
Ave Delta Ct, Excluded Data
Ave Delta Ct
Linear (Ave Delta Ct)
Delta Ct (TxR - FAM)
Log K562 RNA (pg)
y = 3.66x - 20.658
R² = 0.9939
Error Bars: +/-2 SD
A medida que la prueba introduce más ABL, ΔUc se aproxima a o.
K562 RNA | K562 Cells | Dropouts
50 pg | Approx. 2 | 0/6
30 pg | Approx. 1 | 1/6
10 pg | <1 | 3/6

Figura 4. Datos de límite de detección y linealidad.

Bibliografía

[1] Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer Statistics 2005. CA Cancer J Clin. 2005;55:10-30.

[2] Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. Nature. 1973;243:290-293.

[3] NCCN. Clinical Practice Guidelines in Oncology; Chronic Myelogenous Leukemia. Version 1. 2006.

[4] Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. Blood. 2005;105(7):2640-2653.

[5] Kantarjian HM, Talpaz M, Cortes J, et al. Quantitative polymerase chain reaction monitoring of BCR-ABL during therapy with imatinib mesylate (STI571;Gleevec) in chronic-phase chronic myelogenous leukemia. Clin Cancer Res. 2003;9(1):160-6.

[6] Gabert J et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia-A Europe Against Cancer Program. Leukemia 2003;1-40.

[7] Sawyers C. Chronic Myeloid Leukemia. NEJM. 1999;340(17):1330-40.

[8] Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood. 2000;96(10):3343-56.

[9] Goldman JM, Kaeda JS, Cross NC. Clinical decision making in chronic myeloid leukemia based on polymerase chain reaction analysis of minimal residual disease. Blood. 1999;94(4):1484-6.

[10] Radich JP. The detection and significance of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia. Medicina (B Aires) 2000;60 Suppl 2:66-70.

[11] Hochhaus A, Reiter A, Skladny H, et al. Molecular monitoring of residual disease in chronic myelogenous leukemia patients after therapy. Recent Results Cancer Res 1998;144:36-45.

[12] Hochhaus A, Reiter A, Skladny H, et al. Molecular heterogeneity in complete cytogenetic responders after interferon-alpha therapy for chronic myelogenous leukemia: low levels of minimal residual disease are associated with continuing remission. German CML Study Group and the UK MRC CML Study Group. Blood. 2000;95(1):62-6.

[13] Radich JP, Gehly G, Gooley T, et al. Polymerase chain reaction detection of the BCR-ABL fusion transcript after allogeneic marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: results and implications in 346 patients. Blood 1995;85(9):2632-8.

[14] Olavarria E, Kanfer E, Szydlo R, et al. Early detection of BCR-ABL transcripts by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction predicts outcome after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. Blood. 2001;97(6):1560-5.

[15] Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia-A Europe Against Cancer Program.

[16] Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) - a Europe Against Cancer Program. Leukemia. 2003;17:2474-2486.

[17] van der Velden VH, Boeckx N, Gonzalez M, et al. Differential stability of control gene and fusion gene transcripts over time may hamper accurate quantification of minimal residual disease--a study within the Europe Against Cancer Program. Leukemia. 2004;18:884-886.

[18] van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. Leukemia. 2003;17:1013-1034.

[19] World Health Organization. Guidelines on Standard Operating Procedures for HAEMATOLOGY, from http://w3.whosea.org/EN/Section10/Section17/Section53.htm.

[20] U.S. Centers for Disease Control. Morbidity and Mortality Weekly Review. 1987;36(suppl. 2S):2S-18S.

[21] NIOSH Publication No. 2005-151: NIOSH Pocket Guide to Chemical Hazards, September 2005.

[22] CLSI. Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline. CLSI document EP5-A (ISBN 1-56238-368-X). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898, USA, 1999.

Aviso de la patente al comprador

La compra de este producto permite al comprador utilizar este sistema para el funcionamiento de servicios de diagnóstico para diagnósticos *in vitro* en seres humanos. Mediante este documento no se establece ninguna patente general ni se concede ninguna licencia distintas al derecho de uso específico que se deriva de la compra.

Asistencia

Si desea obtener asistencia, puede ponerse en contacto con Cepheid mediante los siguientes datos de contacto. No olvide facilitar el número de serie del instrumento y el Id. del lote de reactivos si realiza una llamada o envía un correo electrónico.

Estados Unidos

Para acceder al servicio técnico, utilice los siguientes datos de contacto:

Tel.: +1.888.838.3222
Correo electrónico: techsupport@cepheid.com

Puede ponerse en contacto con Cepheid por teléfono de lunes a viernes y de 6 a.m. a 5 p.m. (hora del Pacífico).

Unión Europea

Para acceder al servicio técnico, utilice los siguientes datos de contacto:

Tel.: +33.563.82.53.19
Correo electrónico: techsupport@cepheideurope.fr

Otras oficinas

Póngase en contacto con su representante local de Cepheid.

Tabla de símbolos

Símbolo	Significado
	Número de referencia
	Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*
	No reutilizar
	Fabricante
	Contiene suficiente cantidad para <n> pruebas
	Control
	Representante autorizado en la Unión Europea
	Límite de temperatura
	Riesgo biológico

Fabricante

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089-1189

Teléfono: +1.408.541.4191
Fax: +1.408.541.4192

EC REP Representante autorizado

Cepheid Europe
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
Francia

Tel.: +33.563.82.53.00
Fax: +33.563.82.53.01
Correo electrónico: cepheid@cepheideurope.fr

CE IVD

Febrero de 2006

Italiano

Dispositivo medico per diagnostica *in vitro*

Nome registrato

Xpert BCR-ABL Monitor™

Nome comune o usuale

Xpert BCR-ABL Monitor

Uso previsto

Xpert BCR-ABL Monitor, che rileva la traslocazione cromosomica BCR-ABL, è un saggio di PCR real time con retrotrascrizione (RRT-PCR) da utilizzarsi come strumento nel monitoraggio del trascritto p210 (b2a2 e b3a2) nei linfociti del sangue periferico (PBL) di pazienti con leucemia mieloide cronica (LMC). Un aumento significativo del trascritto p210 deve essere confermato da un altro metodo, per esempio dall'analisi citogenetica standard in metafase di un campione di midollo osseo del paziente.

Riepilogo e spiegazione

La leucemia mieloide cronica (LMC) rientra in un gruppo di malattie denominate disordini mieloproliferativi, con 4600 nuovi casi diagnosticati e 850 decessi nel 2005.[1] Oltre il 95% dei pazienti con LMC presenta il caratteristico cromosoma Philadelphia (Ph1) che deriva da una traslocazione reciproca tra le braccia lunghe dei cromosomi 9 e 22. La traslocazione comporta il trasferimento del gene Abelson (ABL) situato sul cromosoma 9 nella regione BCR (breakpoint cluster region) del cromosoma 22, dando origine a un gene di fusione BCR-ABL.[2, 4] Il gene di fusione produce una proteina, p210 (b2a2 e b3a2), una tirosina-chinasi con attività deregolata che svolge un ruolo chiave nello sviluppo della LMC.[3]

Le linee guida attuali dell'Europe Against Cancer e della National Comprehensive Cancer Network (NCCN) per la gestione dei pazienti con LMC richiedono l'uso di saggi della PCR con retrotrascrizione (RT-PCR) di trascrizione inversa (RT-PCR) all'esordio della malattia (LMC) in fase cronica, nel monitoraggio della malattia residua minima e nell'identificazione dei pazienti che possono essere a rischio elevato di recidiva.[3, 15] La RT-PCR si è rivelata un metodo accurato ed estremamente sensibile per il rilevamento del gene di fusione BCR-ABL,[3-14] ed è più sensibile della FISH (Fluorescence In Situ Hybridization, ibridazione in situ fluorescente) o della citogenetica.[3] Un ulteriore vantaggio della PCR quantitativa rispetto alla FISH e alla citogenetica è la correlazione elevata di risultati PCR ottenuti da campioni di midollo osseo e di sangue periferico.[3, 15] Perciò, la PCR potrebbe potenzialmente ridurre le aspirazioni del midollo osseo attualmente necessarie nei pazienti con LMC. La PCR quantitativa diventerà, probabilmente, la tecnica standard per il monitoraggio della malattia residua, anche se il metodo, attualmente, non è ampiamente disponibile a causa della variazione delle tecniche e dei controlli, nonché della mancanza di saggi disponibili in commercio.[3]

Principio della procedura

Il sistema GeneXpert Dx consente di automatizzare e integrare la purificazione dei campioni, l'amplificazione degli acidi nucleici e il rilevamento della sequenza bersaglio in campioni semplici e complessi utilizzando la RRT-PCR real time. Il sistema è composto da uno strumento, un personal computer e dal software già installato per l'esecuzione di analisi su campioni raccolti e per la visualizzazione dei risultati. Il sistema richiede l'uso di cartucce GeneXpert Dx monouso,nelle cartucce sono contenuti i reagenti per la PCR e sempre nella cartuccia avviene la reazione di PCR. Poiché le cartucce sono indipendenti, non sussiste alcun rischio di contaminazione crociata. Per una descrizione completa del sistema, vedere il *Manuale dell'operatore del sistema GeneXpert Dx*.

Xpert BCR-ABL Monitor, utilizzato con il sistema GeneXpert Dx, è progettato per rilevare il trascritto con traslocazione BCR-ABL e la sequenza del controllo endogeno ABL in campioni di sangue periferico.[15-18] In particolare, i primer e la sonda BCR-ABL sono progettati per il rilevamento della traslocazione MBR (major breakpoint region) della p210 (b2a2 e b3a2) BCR-ABL e i primer e la sonda ABL sono progettati per il rilevamento della sequenza ABL. Fino ad oggi non è stata riportata alcuna sovrapposizione dei primer o delle sonde ABL sul sito di mutazione di qualsiasi chinasi ABL.

Per eseguire un'analisi, la miscela di campione e di tre reagenti viene trasferita nelle camere designate della cartuccia Xpert BCR-ABL Monitor, la cartuccia viene caricata nello strumento e le informazioni sull'analisi vengono fornite nel software del sistema. Durante il processo dell'analisi, il sistema GeneXpert Dx (1) sposta il campione e i reagenti nelle diverse camere della cartuccia, (2) isola l'RNA totale dal sangue intero legando l'RNA al materiale in fase solida, (3) lava e risciacqua gli inibitori, (4) eluisce l'RNA, (5) idrata le microsfere dei reagenti e combina la miscela con l'RNA eluito, (6) sposta la miscela di campione e reagenti nella provetta di reazione, (7) esegue i controlli di qualità per assicurare la riuscita della preparazione dei campioni ed (8) esegue la PCR nested real time con retrotrascrizione (RT-PCR). Il tempo di analisi per BCR-ABL richiede circa 2 ore e 20 minuti.

Reagenti e strumenti

Materiale fornito

Il kit Xpert BCR-ABL Monitor (BCR-100N-10) contiene reagenti sufficienti per elaborare 10 campioni dei pazienti o di controllo qualità. Il kit contiene 10 singoli test. Ogni confezione del test contiene il seguente materiale:

- Cartuccia Xpert BCR-ABL Monitor
  - Primer (diretti e inversi)
  - Sonde
  - dNTP
  - Transcrittasi inversa
  - Taq polimerasi
  - Tris-HCl, pH 8,6
  - HEPES, pH 7,2
  - KCl
  - $MgCl_2$
  - BSA (sieroalbumina bovina)
- Reagenti per la preparazione dei campioni di sangue
  - Vaschetta portacampione (S)
  - Proteinasi K (PK) - 50 µl
    - $CaCl_2$
    - Glicerolo
    - Proteinasi K
    - Tris-HCl, pH 7,5
  - Reagente di lisi (LY) - 1,8 ml
    - $CaCl_2$
    - Guanidina HCl
    - EDTA
    - SDS
    - Tris-HCl, pH 6,4
    - Tween-20
    - Urea
  - Reagente di lavaggio (1) - 3,3 ml
    - Etanolo
    - Guanidina tiocianato
    - Tris-HCl, pH 7,0
  - Reagente di risciacquo (2) - 1,8 ml
    - Cisteamina HCl
    - EDTA
    - KCl
    - Monotioglicerolo (MTG)
    - PEG
    - Sodio azide
    - Tris, pH 7,0
    - Tween-20
    - Acqua
  - Reagente di eluizione (3) - 1,8 ml
    - Acqua trattata con DEPC
    - Sodio azide

Nota:

- le schede dei dati sulla sicurezza dei materiali (MSDS, Material Safety Data Sheet) per tutti i reagenti forniti in questo saggio sono disponibili su richiesta all'Assistenza tecnica Cepheid.
- La sieroalbumina bovina (BSA) presente in questo prodotto è stata prodotta esclusivamente da plasma bovino proveniente dagli Stati Uniti. Anche la produzione della BSA viene eseguita negli Stati Uniti. Gli animali non sono stati nutriti con proteine bovine o altre proteine animali; gli animali hanno superato i test ante mortem e post mortem. Durante l'elaborazione, il materiale non è stato miscelato con altro materiale animale.

Conservazione e manipolazione

- Conservare il contenuto del kit Xpert BCR-ABL Monitor kit a 2 – 8° C.
- Non utilizzare reagenti o cartucce oltre la data di scadenza.
- Non aprire i reagenti finché non sono pronti per l'uso.
- Utilizzare il saggio Xpert BCR-ABL Monitor entro 30 minuti dall'apertura della confezione.
- Ad eccezione del reagente di lisi, non utilizzare reagenti diventati torbidi o scoloriti.
- Se il reagente di lisi è torbido, riscaldarlo a 56° C per 5 minuti prima dell'uso.

Materiali necessari ma non forniti

- Sistema GeneXpert Dx
- Vortex
- Microcentrifuga (minimo 1000 g)
- Pipette e puntali per pipette con filtro resistente all'aerosol (dimensioni suggerite: 200 µl e 1000 µl)
- Etanolo al 100%
- (Facoltativo) Pipette di trasferimento

Nota: il numero di catalogo del sistema GeneXpert Dx varia in base alla configurazione. Per la configurazione desiderata e il numero di catologo corrispondente, contattare Cepheid.

Avvertenze e precauzioni

- Tutti i campioni biologici devono essere trattati come se fossero in grado di trasmettere agenti infettivi. Poiché è spesso impossibile sapere quale campione potrebbe essere infettivo, tutti i campioni di derivazione umana devono essere trattati adottando le precauzioni universali. Le linee guida per la manipolazione dei campioni sono disponibili presso l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS)[19] o gli U.S. Centers for Disease Control and Prevention (Centri per il controllo e la prevenzione delle malattie).[20]
- Tutti i materiali pericolosi devono essere smaltiti in conformità alle linee guida sulla sicurezza del proprio laboratorio.
- Non sostituire i reagenti Xpert GBS con altri reagenti.
- Per un determinato periodo di tempo, la sodio azide può reagire con rame, piombo, ottone o leghe per saldatura presenti negli impianti idraulici a formare un accumulo di composti altamente esplosivi di azide di piombo e azide di rame.[21]
- Il reagente di lavaggio contiene guanidina tiocianato, che può formare composti altamente reattivi se combinata con candeggina. Se il liquido che contiene questo reagente viene versato, pulire l'area con acqua e detergente da laboratorio.
- La mancata osservanza delle procedure e delle condizioni descritte in questo documento e l'uso di reagenti diversi da quelli forniti in questo kit possono causare risultati non corretti e reazioni avverse. Ad esempio, non aggiungere più del quantitativo richiesto di campione e reagenti.
- Conte leucocitarie eccessivamente elevate potrebbero causare un accumulo di pressione nella cartuccia e provocare l'interruzione delle corse.
- La caduta o l'agitazione delle cartucce Xpert BCR-ABL Monitor dopo aver aggiunto campione e reagenti può causare il versamento del contenuto nelle camere sbagliate, producendo risultati non validi. Anche le provette di reazione piegate o rotte possono produrre risultati non validi. Non scuotere la cartuccia ed evitare di farla cadere. Se la provetta di reazione è piegata o rotta, non utilizzare la cartuccia.

Raccolta e trasporto dei campioni

Raccogliere i campioni di sangue periferico secondo le tecniche standard per la RT-PCR in vigore presso l'istituto. Raccogliere i campioni di sangue nelle provette contenenti EDTA o citrato di sodio come anticoagulante. Conservare i campioni di sangue a 2 – 8° C e analizzare entro 48 ore dalla raccolta. Non utilizzare eparina come anticoagulante, poiché potrebbe inibire la reazione della PCR.

Procedura

Precauzioni

- Attenersi alle procedure di sicurezza del proprio laboratorio relative alla manipolazione di sostanze chimiche e di campioni.
- Dedicare un set di pipette e reagenti esclusivamente alla preparazione dei campioni. Separare le cartucce usate dalle cartucce non utilizzate e dai reagenti.
- Non aprire il coperchio della cartuccia Xpert BCR-ABL Monitor eccetto quando si aggiungono il campione e i reagenti.
- Non scuotere la cartuccia.
- Non caricare una cartuccia Xpert BCR-ABL Monitor che è caduta o è stata scossa dopo aver inserito il campione e i reagenti. Non caricare una cartuccia con una provetta di reazione danneggiata.
- Non aprire le cartucce Xpert BCR-ABL Monitor usate.
- Smaltire le cartucce Xpert BCR-ABL Monitor usate in conformità alle linee guida sulla sicurezza del proprio laboratorio.

Operazioni preliminari

Prima di iniziare la procedura, centrifugare brevemente i seguenti reagenti a 1000 g per 10 secondi:

- Proteinasi K (PK)
- Reagente di lisi (LY)
- Reagente di risciacquo (2)
- Reagente di eluizione (3)

Preparazione della cartuccia

1. Rimuovere i reagenti per la preparazione dei campioni dal vassoio sigillato.
2. Aggiungere 40 µl di proteinasi K (PK) al flacone vuoto da 5 ml con etichetta Sample Container (S) (Vaschetta portacampione, S).
3. Aggiungere 200 µl di campione di sangue alla vaschetta portacampione (S) che contiene già proteinasi K.
4. Vortexare per 5 secondi.
5. Incubare a temperatura ambiente per 1 minuto.
6. Aggiungere 1 ml di reagente di lisi (LY) alla vaschetta portacampione (S).
7. Vortexare per 10 secondi.
8. Incubare a temperatura ambiente per 10 minuti.
9. Aggiungere 1 ml di etanolo al 100% alla vaschetta portacampione (S).
10. Vortexare per 10 secondi. Mettere da parte.
11. Rimuovere una cartuccia dal vassoio sigillato.

12. Aprire il coperchio della cartuccia e trasferire il contenuto dalle provette dei reagenti e dalla vaschetta portacampione alle camere della cartuccia come riportato di seguito (figure 1):
    - **S** - Pipettare l'intero contenuto dalla vaschetta portacampione (S).
    - **1** - Pipettare almeno 2,1 ml del contenuto dalla provetta del reagente di lavaggio (1).
    - **2** - Pipettare almeno 1 ml del contenuto dalla provetta del reagente di risciacquo (2).
    - **3** - Pipettare almeno 1 ml del contenuto dalla provetta del reagente di eluizione (3).
13. Chiudere il coperchio della cartuccia. Assicurarsi che il coperchio scatti in posizione.

Importante: accertarsi di caricare la cartuccia nello strumento GeneXpert Dx e avviare l'analisi entro 15 minuti dalla preparazione della cartuccia.

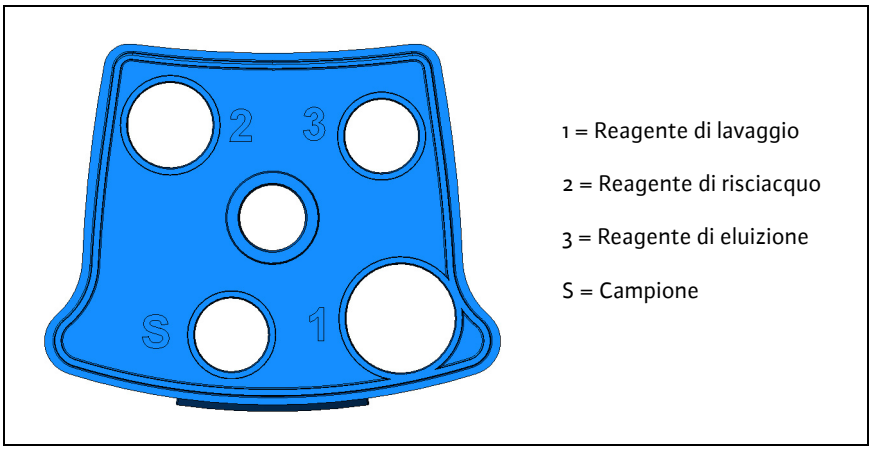

Figure 1. Camere della cartuccia Xpert BCR–ABL Monitor

Esecuzione dell'analisi

Questa sezione elenca i passaggi di base dell'esecuzione dell'analisi. Per istruzioni dettagliate, vedere il *Manuale dell'operatore del sistema GeneXpert*.

1. Accendere il computer, quindi accendere lo strumento GeneXpert Dx.
2. Sul desktop di Windows® fare doppio clic sull'icona di collegamento GeneXpert Dx.
3. Connettersi al software del sistema GeneXpert Dx con il proprio nome utilizzatore e la password.
4. Nella finestra GeneXpert Dx System (Sistema GeneXpert Dx), fare clic su **Define Assays (Definisci i saggi)** e accertarsi che la definizione del saggio Xpert BCR-ABL Monitor sia importata nel software. (Vedere le istruzioni fornite nel CD del saggio). Se non si possiede il CD Xpert BCR-ABL Monitor, contattare l'Assistenza tecnica Cepheid.
5. Nella finestra GeneXpert Dx System (Sistema GeneXpert Dx), fare clic su **Create Test (Crea analisi)**. Verrà visualizzata la finestra **Create Test (Crea analisi)**.
6. Eseguire la scansione del codice a barre della cartuccia Xpert BCR-ABL Monitor. Il software completa automaticamente i campi seguenti: **Select Assay (Seleziona saggio), Reagent Lot ID (ID lotto reagenti) ed Expiration Date (Data di scadenza).**
7. Selezionare il modulo dello strumento.
8. Nella casella **Sample ID (ID campione)**, eseguire la scansione o digitare l'ID del campione. Accertarsi di digitare correttamente l'ID del campione. L'ID del campione è associato ai risultati dell'analisi ed è mostrato nella finestra **View Results (Visualizza risultati)** e in tutte le relazioni.
9. Fare clic su **Start Test (Avvia analisi)**. Nella finestra di dialogo visualizzata, digitare la password.
10. Aprire lo sportello del modulo dello strumento con la spia verde lampeggiante e caricare la cartuccia. Chiudere lo sportello. Al termine dell'analisi, la spia del modulo dello strumento si spegne.
11. Aprire lo sportello del modulo dello strumento e rimuovere la cartuccia. Attenersi alle linee guida sulla sicurezza del proprio laboratorio per lo smaltimento della cartuccia.

Visualizzazione e stampa dei risultati

Per istruzioni su come visualizzare e stampare i risultati, vedere il *Manuale dell'operatore del sistema GeneXpert*.

CONTROL Controllo di qualità

Ogni analisi contiene un controllo endogeno (ABL) e un controllo per il controllo sonda. Non sono necessari controlli esterni. È, tuttavia, possibile analizzare due controlli esterni una volta al mese, per un ulteriore controllo di qualità.

- **Controllo endogeno**: normalizza il target (BCR-ABL) e assicura l'utilizzo di campione sufficiente nell'analisi. Il controllo endogeno, grazie alla sua bassa variabilità, può anche essere utilizzato per indicare la contaminazione da inibitori presenti nel campione. Il controllo endogeno viene preso dal campione.
- **Controllo sonda**: verifica la presenza e l'integrità delle sonde marcate. Uno stato del controllo sonda Pass (Ammesso) indica che i risultati del controllo sonda soddisfano i criteri di accettazione.

Interpretazione dei risultati

ABL C_t valido

- ABL C_t deve essere maggiore o uguale a 12 e minore o uguale a 18, con un valore del punto finale maggiore o uguale a 200.
- Se il valore ABL C_t è minore di 12, il punto finale è minore di 200 o la curva PCR è deformata, ripetere l'analisi utilizzando 20 µl del campione originale.
- Se il valore ABL C_t è maggiore di 18, ripetere l'analisi con un campione fresco.

BCR-ABL C_t valido positivo

- BCR-ABL C_t deve essere maggiore o uguale a 12 o deve essere minore o uguale a 32, con un valore del punto finale maggiore o uguale a 40.
- Se il valore BCR-ABL C_t è minore di 12, ripetere l'analisi utilizzando 20 µl del campione originale.
- Se il valore BCR-ABL C_t è maggiore di 32, i trascritti BCR-ABL non vengono rilevati.

Risultati qualitativi

- Qualsiasi valore BCR-ABL C_t minore di 32 e che presenta un valore ABL C_t valido produce un rilevamento positivo per i trascritti BCR-ABL.
- L'assenza di un valore BCR-ABL C_t o di un valore BCR-ABL maggiore di 32, insieme a un risultato ABL valido, verrà classificata non rilevabile per BCR-ABL.

Risultati quantitativi

Insieme ad ogni kit Xpert BCR-ABL Monitor viene fornito un certificato di analisi, che contiene una curva standard specifica per il lotto per Xpert BCR-ABL Monitor e un valore di efficienza ($E_{\Delta Ct}$). La curva standard riporta ΔC_t ($C_{t(ABL)}$ - $C_{t(BCR-ABL)}$) come funzione della concentrazione di K562 RNA in un background di RNA di sangue intero normale. Il valore di efficienza ($E_{\Delta Ct}$) viene calcolato dalla pendenza della curva standard nel modo seguente: $E_{\Delta Ct} = 10^{(1/\text{pendenza})}$.

- **Analisi positive BCR-ABL**: per un risultato positivo dell'analisi, la % rapporto BCR-ABL/ABL viene calcolata con l'equazione seguente. Il valore $E_{\Delta Ct}$ si ottiene dal certificato specifico per il lotto dell'analisi che è fornito con il kit del saggio. Il valore ΔC_t Analisi si ottiene dalla finestra View Results (Visualizza risultati), colonna Target Delta Ct (Delta Ct Obiettivo), del software del sistema GeneXpert Dx (figure 2).

  % rapporto BCR-ABL/ABL = $E_{\Delta Ct}^{(\Delta Ct)} \times 100$

  Esempio

  $E_{\Delta Ct}$ specifico per il lotto = 1,915
  ΔC_t Analisi = -2,9
  % rapporto BCR-ABL/ABL = $1{,}915^{(-2{,}9)} \times 100 = 15{,}195\%$

  Risultato: positivo per BCR-ABL, rilevato ad un livello di 15,195%

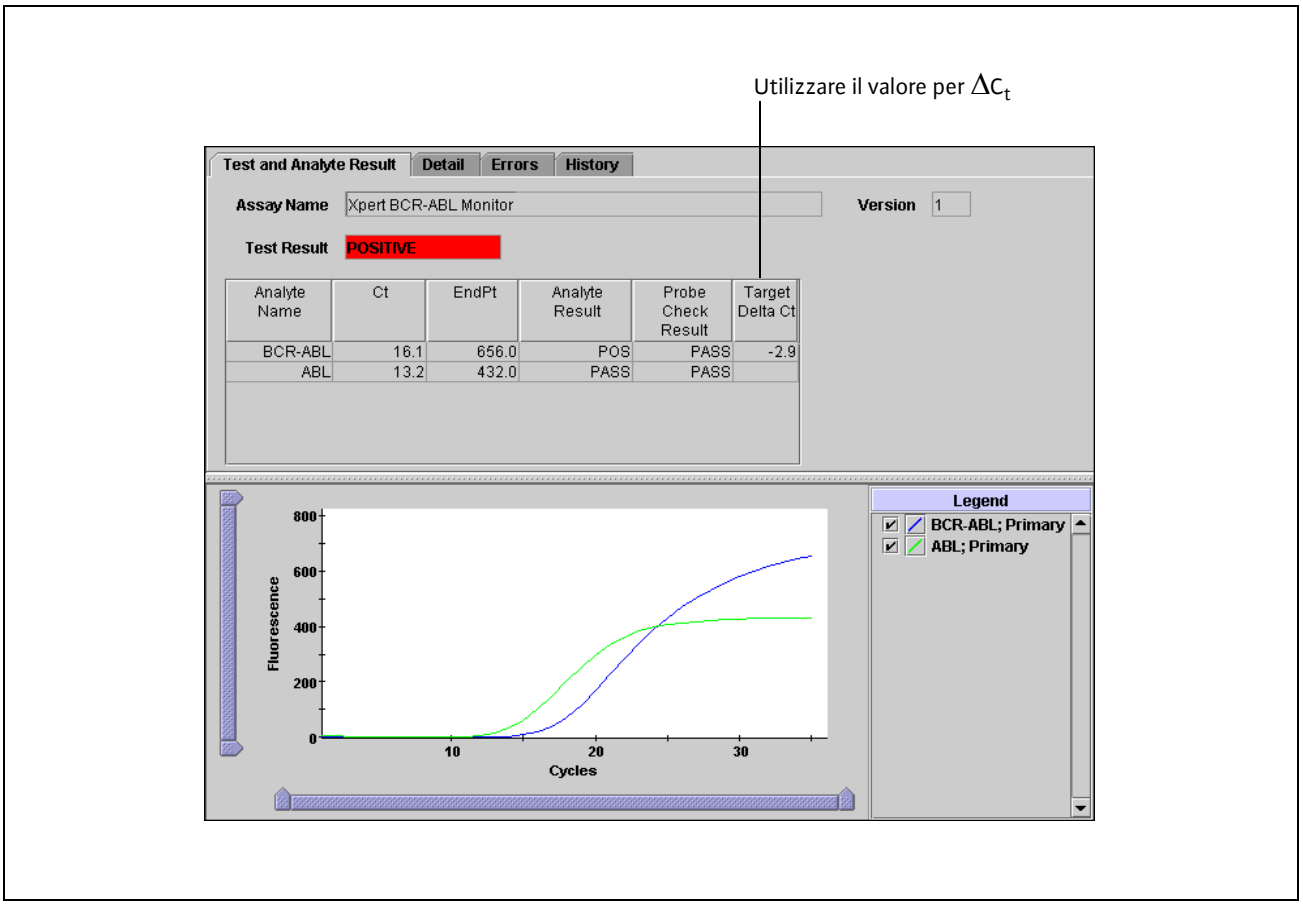

Figure 2. Finestra GeneXpert Dx System (Sistema GeneXpert Dx) – View Results (Visualizza risultati), risultato positivo.

- **Analisi negative BCR-ABL**: per valori ABL maggiori di 12 ma minori di 18, se BCR-ABL non è rilevabile, prima di riportare i risultati calcolare un rapporto teorico BCR-ABL. Per compiere questa operazione, sottrarre 32 dal valore ABL C_t dell'analisi (ABL Ct di analisi - 32). Il valore ABL C_t si ottiene nella finestra View Results (Visualizza risultati), colonna Ct, del software del sistema GeneXpert Dx (figure 3). Calcolare la % rapporto BCR-ABL teorico. Riportare un risultato minore della % del rapporto teorico, il valore che sarebbe stato osservato se un valore BCR-ABL C_t vero di 32 fosse stato misurato.

  Esempio

  $E_{\Delta Ct}$ specifico per il lotto = 1,915
  ABL C_t Analisi = 15,4
  ΔC_t teorico = (15,4 - 32) = -16,6
  % rapporto BCR-ABL/ABL = $1,915^{(-16,6)} \times 100 = 0,0021\%$

  Risultato: BCR-ABL non rilevabile in corrispondenza del limite di rilevamento di 0,0021%

Se non viene rilevato alcun valore BCR-ABL, utilizzare il valore ABL per determinare se sono necessarie analisi supplementari. Ad esempio, se il valore ABL C_t è maggiore di 15, il limite di rilevamento potrebbe essere maggiore di 0,001%. Nel caso si sospettino bassi livelli di BCR-ABL, ripetere l'analisi. Anche i valori ABL C_t ritardati potrebbero richiedere la ripetizione dell'analisi.

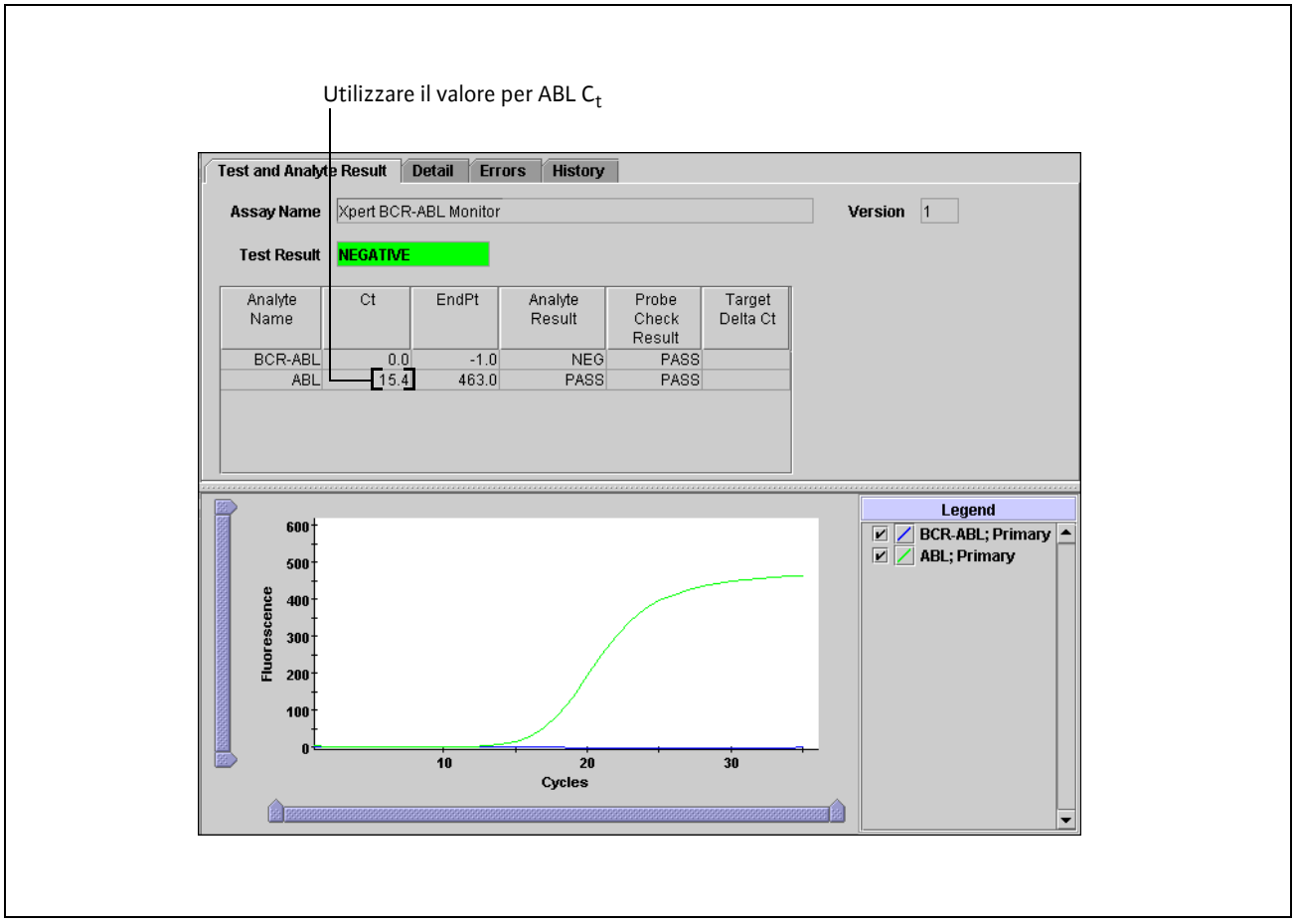

Figure 3. Finestra GeneXpert Dx System (Sistema GeneXpert Dx) – View Results (Visualizza risultati), risultato negativo.

Motivi per ripetere il saggio

Un risultato INVALID (NON VALIDO) e/o ND indica che si è verificato un errore in uno o entrambi i controlli (ABL o Controllo sonda) o un problema di elaborazione. La corsa non è valida e deve essere ripetuta con un campione fresco.

Per una descrizione dei messaggi di errore e delle informazioni relative alla risoluzione dei problemi, vedere il *Manuale dell'operatore del sistema GeneXpert Dx*.

Limitazioni

- Le prestazioni di Xpert BCR-ABL Monitor sono state validate con le procedure fornite esclusivamente in questo foglio illustrativo. Le modifiche apportate a queste procedure possono alterare le prestazioni dell'analisi.
- I risultati di Xpert BCR-ABL Monitor devono essere interpretati contestualmente agli altri dati clinici e di laboratorio a disposizione del medico.
- Xpert BCR-ABL Monitor non rileverà la p190 o altre traslocazioni che possono essere presenti in un campione di sangue periferico di un paziente affetto da leucemia.
- Xpert BCR-ABL Monitor deve essere eseguito utilizzando sangue intero anticoagulato con EDTA o citrato. L'eparina non è adatta come anticoagulante, poiché inibisce la reazione della PCR.
- Ciascuna cartuccia Xpert BCR-ABL Monitor monouso è utilizzata per elaborare un'analisi. Non riutilizzare le cartucce usate.

Caratteristiche sulle prestazioni

Precisione

La precisione è stata valutata in uno studio comparativo, condotto in cieco, in tre laboratori con l'utilizzo di quattro campioni con diverse concentrazioni di BCR/ABL. Nello studio sono stati inclusi complessivamente 240 campioni. I campioni dello studio comprendevano quattro livelli di campioni: livelli di RNA BCR-ABL negativo, basso, moderato e alto. Questi campioni sono stati preparati con sangue intero (raccolto con anticoagulante citrato) da donatori sani normali con quantitativi diversi di K562 RNA (Catalogo Ambion Nr. 7832) aggiunti ai campioni di sangue lisati. Ciascun laboratorio ha ricevuto complessivamente 80 campioni che comprendevano 20 campioni provenienti da ciascuno dei quattro diversi livelli. I campioni sono stati analizzati in 20 corse di quattro campioni, quattro corse al giorno per cinque giorni. Quattro campioni, un campione di ogni livello, sono stati inclusi in ciascuna corsa. Allo studio hanno partecipato due tecnici di ogni laboratorio, ognuno ha eseguito due corse di quattro campioni ogni giorno. GeneXpert ha determinato il livello di BCR/ABL in ogni campione. La precisione è stata stimata in conformità alle linee guida del CLSI per la valutazione della precisione dei dispositivi di chimica clinica.[22]

Table 1. Precisione del saggio.

Sito	Campione	N	Media % BCR-ABL/ABL	% BCR-ABL/ABL dev. std.	95% CI	% CV
1	BCR-ABL negativo	20	< 0.000133% (negativo)	—	—	—
2	BCR-ABL negativo	20	< 0.000175% (negativo)	—	—	—
3	BCR-ABL negativo	20	< 0.000163% (negativo)	—	—	—
Complessivi	BCR-ABL negativo	60	< 0.000157% (negativo)	—	—	—
1	BCR-ABL basso	20	0.00477%	0.00477%	0.00218 – 0.00737%	100.0%
2	BCR-ABL basso	19	0.00285%	0.00285%	0.00125 – 0.00445%	100.0%
3	BCR-ABL basso	20	0.00528%	0.00528%	0.00241 – 0.00815%	100.0%
Complessivi	BCR-ABL basso	59	0.00430%	0.00524%	0.00273 – 0.00587%	121.8%
1	BCR-ABL moderato	20	1.003%	0.324%	0.827 – 1.179%	32.3%
2	BCR-ABL moderato	20	0.856%	0.427%	0.624 – 1.088%	49.8%
3	BCR-ABL moderato	19	1.005%	0.433%	0.762 – 1.248%	43.1%
Complessivi	BCR-ABL moderato	59	0.954%	0.397%	0.835 – 1.073%	41.6%
1	BCR-ABL alto	20	12.18%	2.40%	10.88 – 13.49%	19.7%
2	BCR-ABL alto	20	12.34%	7.31%	8.36 – 16.32%	59.2%
3	BCR-ABL alto	20	12.18%	4.10%	9.95 – 14.41%	33.7%
Complessivi	BCR-ABL alto	60	12.24%	5.03%	10.74–13.73%	41.1%

Prestazioni cliniche:

Le prestazioni del saggio sono state analizzate in tre laboratori utilizzando una raccolta di 46 campioni di pazienti con LMC. Entrambi i laboratori hanno eseguito il saggio sviluppato nel proprio laboratorio per un confronto. I dati sono stati raggruppati in tre categorie:

- Negativo (valore BCR-ABL rilevato <0,01%)
- Positivo basso (valore BCR-ABL rilevato compreso tra 0,01% e 0,05%)
- Positivo alto (valore BCR-ABL rilevato >0,05%)

Table 2. Prestazioni del saggio

Risultati dell'analisi	Numero di campioni LMC
Negativo con entrambi i metodi	17
Negativo con il metodo sviluppato dal laboratorio ma positivo basso con GeneXpert	3
Positivo basso con entrambi i metodi	8
Positivo alto con entrambi i metodi	18

Concordanza di risultati negativi: 17/20 = 85%
Concordanza di risultati positivi: 26/26 = 100%

Specificità

La specificità del saggio è stata analizzata utilizzando 44 campioni di sangue normali con citrato e EDTA provenienti da quattro laboratori. Tutti i campioni normali erano negativi per BCR-ABL e hanno prodotto una specificità del 100%.

La specificità del saggio è stata analizzata anche presso tre laboratori utilizzando una raccolta di 12 campioni di sangue di pazienti con altri disordini ematologico, inclusi leucemia mieloide acuta, linfoma di Hodgkin, mieloma multiplo e linfoma follicolare. Tutti questi campioni erano negativi per BCR-ABL e hanno prodotto una specificità del 100%.

Limite di rilevamento e linearità

La Figure 4 mostra i dati del limite di rilevamento e della linearità generati da una singola corsa di 44 cartucce. La procedura descritta in questo foglio illustrativo è stata utilizzata con le seguenti eccezioni: una serie di diluizioni di Leukemia (K562) Total RNA di Ambion (numero di catalogo 7832) è stata aggiunta a sangue normale anticoagulato con citrato dopo aver aggiunto etanolo alla vaschetta portacampione. Sono state eseguite quattro repliche per ogni concentrazione di RNA con le seguenti eccezioni: sono state eseguite sei repliche per campioni da 30 pg e 10 pg.

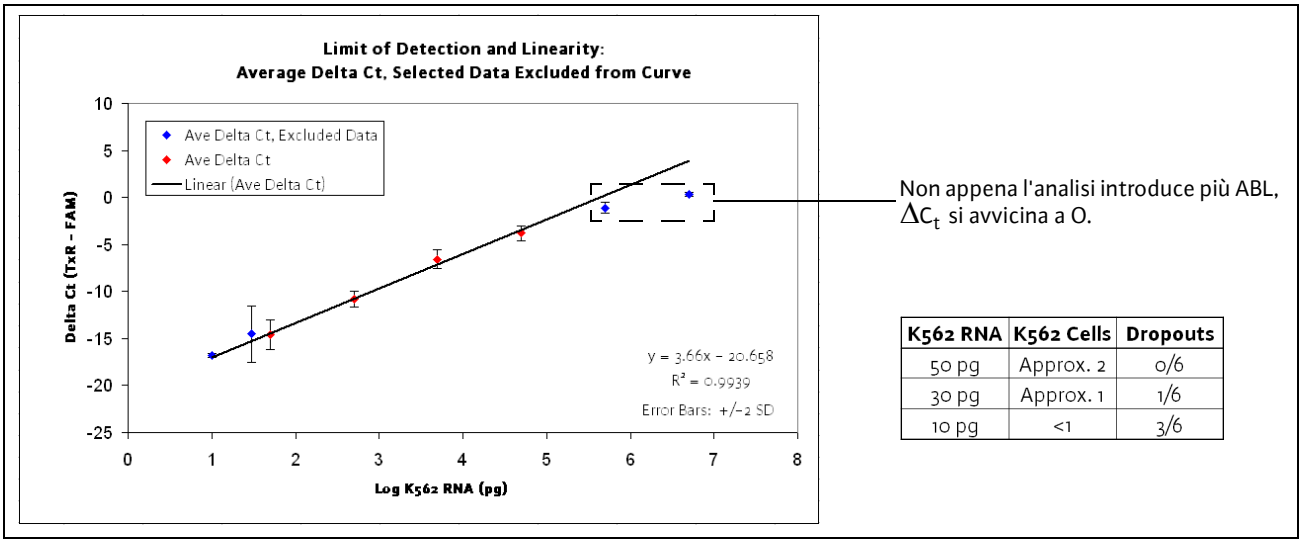
Limit of Detection and Linearity:
Average Delta Ct, Selected Data Excluded from Curve
Ave Delta Ct, Excluded Data
Ave Delta Ct
Linear (Ave Delta Ct)
Delta Ct (TxR - FAM)
Log K562 RNA (pg)
y = 3.66x - 20.658
R² = 0.9939
Error Bars: +/-2 SD
Non appena l'analisi introduce più ABL, ΔCt si avvicina a O.
K562 RNA | K562 Cells | Dropouts
50 pg | Approx. 2 | 0/6
30 pg | Approx. 1 | 1/6
10 pg | <1 | 3/6

Figure 4. Dati del limite di rilevamento e della linearità.

Riferimenti bibliografici

[1] Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer Statistics 2005. CA Cancer J Clin. 2005;55:10-30.

[2] Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. Nature. 1973;243:290-293.

[3] NCCN. Clinical Practice Guidelines in Oncology; Chronic Myelogenous Leukemia. Version 1. 2006.

[4] Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. Blood. 2005;105(7):2640-2653.

[5] Kantarjian HM, Talpaz M, Cortes J, et al. Quantitative polymerase chain reaction monitoring of BCR-ABL during therapy with imatinib mesylate (STI571;Gleevec) in chronic-phase chronic myelogenous leukemia. Clin Cancer Res. 2003;9(1):160-6.

[6] Gabert J et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia-A Europe Against Cancer Program. Leukemia 2003;1-40.

[7] Sawyers C. Chronic Myeloid Leukemia. NEJM. 1999;340(17):1330-40.

[8] Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood. 2000;96(10):3343-56.

[9] Goldman JM, Kaeda JS, Cross NC. Clinical decision making in chronic myeloid leukemia based on polymerase chain reaction analysis of minimal residual disease. Blood. 1999;94(4):1484-6.

[10] Radich JP. The detection and significance of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia. Medicina (B Aires) 2000;60 Suppl 2:66-70.

[11] Hochhaus A, Reiter A, Skladny H, et al. Molecular monitoring of residual disease in chronic myelogenous leukemia patients after therapy. Recent Results Cancer Res 1998;144:36-45.

[12] Hochhaus A, Reiter A, Saussele S, et al. Molecular heterogeneity in complete cytogenetic responders after interferon-alpha therapy for chronic myelogenous leukemia: low levels of minimal residual disease are associated with continuing remission. German CML Study Group and the UK MRC CML Study Group. Blood. 2000;95(1):62-6.

[13] Radich JP, Gehly G, Gooley T, et al. Polymerase chain reaction detection of the BCR-ABL fusion transcript after allogeneic marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: results and implications in 346 patients. Blood 1995;85(9):2632-8.

[14] Olavarria E, Kanfer E, Szydlo R, et al. Early detection of BCR-ABL transcripts by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction predicts outcome after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. Blood. 2001;97(6):1560-5.

[15] Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer Program. Leukemia. 2003;17:2318-2357.

[16] Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) - a Europe Against Cancer Program. Leukemia. 2003;17:2474-2486.

[17] van der Velden VH, Boeckx N, Gonzalez M, et al. Differential stability of control gene and fusion gene transcripts over time may hamper accurate quantification of minimal residual disease--a study within the Europe Against Cancer Program. Leukemia. 2004;18:884-886.

[18] van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. Leukemia. 2003;17:1013-1034.

[19] World Health Organization. Guidelines on Standard Operating Procedures for HAEMATOLOGY, from http://w3.whosea.org/EN/Section10/Section17/Section53.htm.

[20] U.S. Centers for Disease Control. Morbidity and Mortality Weekly Review. 1987;36(suppl. 2S):2S-18S.

[21] NIOSH Publication No. 2005-151: NIOSH Pocket Guide to Chemical Hazards, September 2005.

[22] CLSI. Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline. CLSI document EP5-A (ISBN 1-56238-368-X). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898, USA, 1999.

Avviso di brevetto all'acquirente

L'acquisto di questo prodotto consente all'acquirente di utilizzarlo per le prestazioni dei servizi diagnostici per la diagnostica umana *in vitro*. Con la presente non è concesso alcun brevetto generale o altra licenza di alcun tipo al di fuori di questo specifico diritto di utilizzo dall'acquisto.

Assistenza

Per ricevere assistenza, contattare Cepheid a uno dei seguenti recapiti. Quando si contatta l'Assistenza tramite telefono o posta elettronica, accertarsi di fornire il numero di serie dello strumento e l'ID del lotto reagenti.

Nord America

Per l'assistenza tecnica, utilizzare i seguenti recapiti:

Tel: +1.888.838.3222
E-mail: techsupport@cepheid.com

È possibile contattare telefonicamente l'Assistenza tecnica Cepheid dal lunedì al venerdì, dalle 6 alle 17 (Pacifico).

Unione Europea

Per l'assistenza tecnica, utilizzare i seguenti recapiti:

Tel: +33.563.82.53.19
E-mail: techsupport@cepheideurope.fr

Altri Paesi

Contattare il rappresentante Cepheid locale.

Tabella dei simboli

Simbolo	Significato
	Numero di catalogo
	Dispositivo medico per diagnostica *in vitro*
	Non riutilizzare
	Produttore
	Contiene quantità sufficiente per <n> analisi
	Controllo
	Rappresentante autorizzato nella Comunità europea
	Limitazione della temperatura
	Rischio biologico

Produttore

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089-1189

Telefono: +1.408.541.4191
Fax: +1.408.541.4192

EC REP Rappresentante autorizzato

Cepheid Europe
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
Francia

Tel: +33.563.82.53.00
Fax: +33.563.82.53.01
E-mail: cepheid@cepheideurope.fr

CE IVD

Febbraio 2006